

Epikutane Toleranzinduktion am Maus-Asthma Modell und beim Sommerekzem des Pferdes

Regina Karin Laube

München 2011

Aus dem
Department für Veterinärwissenschaften
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Arbeit angefertigt unter der Leitung von
Univ.-Prof. Thomas Göbel
Angefertigt am Institut für Virologie und
Immunbiologie der Universität Würzburg
(Prof. Dr. Manfred Lutz)

Epikutane Toleranzinduktion am Maus-Asthma Modell und beim Sommerekzem des Pferdes

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität
München

von
Regina Karin Laube
aus Hof
München 2011

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Göbel

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Müller

Tag der Promotion: 12. Februar 2011

Für meine Familie und Ole

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	VI
Tabellenverzeichnis	VIII
Abkürzungsverzeichnis	IX
1 Einleitung und Zielsetzung	1
2 Literaturübersicht	5
2.1 Allergie	5
2.1.1 Allergietypen	6
2.1.2 Allergie vom Soforttyp (Typ I)	8
2.2 Das Sommerkezem	16
2.2.1 Das Allergen: Der Speichel der <i>Culicoides ssp.</i>	18
2.2.2 Die Diagnostik des Sommerkezems	23
2.2.3 Die Therapie des Sommerkezems	27
2.3 Epikutane Toleranzinduktion	31
2.3.1 Toleranzmechanismen	32
2.3.2 Die Haut als Immunorgan	36
2.3.3 Penetrationsfähigkeit der Haut	37
2.3.4 Toleranzinduktion durch die epikutane, allergenspezifische Immuntherapie	39
3 Material und Methoden	41
3.1 Tiere	41
3.1.1 Mäuse	41
3.1.2 Pferde	41

3.2	Material	42
3.2.1	Zellkulturmedium R10	43
3.2.2	Paraformaldehyd 4%	44
3.2.3	Ammoniumchlorid-Lösung 1,6%	44
3.2.4	Narkose Maus	45
3.2.5	Letale Narkose Maus	45
3.2.6	Pipes A	46
3.2.7	Pipes B	46
3.2.8	PBS mit 2% EDTA	47
3.2.9	<i>Culicoides nubeculosus</i> , Lyophilisat (Greer Labs)	47
3.2.10	Allergencreme - Therapie	48
3.2.11	Allergencreme - Placebo	49
3.3	Methode OVA-Asthma-Modell Maus	49
3.3.1	Induktion von OVA-allergischem Asthma bei der Maus	49
3.3.2	Analyse OVA-Asthma-Modell Maus	51
3.3.3	Zytozentrifugation der BAL	53
3.3.4	Restimulation der Milz und der mediastinalen Lymphknoten	54
3.3.5	Histologie der Lunge	55
3.3.6	Messung der Zytokine	56
3.4	Toleranztherapie Maus	56
3.5	Allgemeine und spezielle Haut-Untersuchung des Pferdes	58
3.6	Blutanalyse Pferd	59
3.6.1	Blutentnahme beim Pferd	59
3.6.2	Blutbearbeitung	59
3.6.3	Zellseparation	61
3.6.4	Restimulation der Pferdegranulozyten	62
3.6.5	'Histamin Research ELISA'	64
3.7	Toleranztherapie Pferd	64
3.7.1	Symptom-Evaluierung	65
3.7.2	Toleranz-Therapie	66
3.8	Statistik	67

3.9	Verzeichnis der Geräte, Verbrauchsmaterialien und Reagenzien	68
4	Ergebnisse	73
4.1	Epikutane Therapie am Maus-Asthma-Modell	73
4.2	Asthma Analyse	74
4.2.1	Zytologische Analyse der BAL	75
4.2.2	Zytokine der BAL	78
4.2.3	Zytokin-Bestimmung im Überstand der OVA-Peptid restimulierten LN-Zellen	81
4.2.4	Zytokin-Bestimmung im Überstand der OVA-Peptid restimulierten Milzzellen	84
4.2.5	Histologie der Lunge	87
4.3	Auswahl der Pferde	89
4.4	Allergenspezifische Allergiediagnose	92
4.4.1	Physikalische und Spontane Histaminfreisetzung	92
4.4.2	Allergenspezifische Allergiediagnostik-Sommer	94
4.4.3	Allergenspezifische Allergiediagnostik-Winter	94
4.5	EPIT beim Sommerekzem des Pferdes	96
4.5.1	Studie 1, Island-Pferde, Jahr 1	100
4.5.2	Studie 2, Island-Pferde, Jahr 2	105
4.5.3	Studie 3, weitere Pferde, Jahr 1	110
5	Diskussion	114
5.1	Immuntherapien	114
5.2	EPIT am Maus-Asthma-Modell	117
5.2.1	EPIT in Form einer Pflastertherapie	117
5.2.2	Analyse der Immunmechanismen nach einer EPIT	119
5.3	EPIT am Sommerekzem des Pferdes	120
5.3.1	Allergiediagnostik beim Pferd	121
5.3.2	Allergitherapie beim Pferd	123
5.3.3	Ausblick	126

6 Zusammenfassung	127
7 Summary	130
Literaturverzeichnis	132
Danksagung	153

Abbildungsverzeichnis

1.1	Transdermale Pflaster	3
2.1	Typ I Allergie	12
2.2	Folgen des Juckreizes beim Sommerekzem	16
2.3	Symptome des Sommerekzems	17
2.4	<i>Culicoides ssp.</i> im Größenvergleich	19
2.5	<i>Culicoides ssp.</i>	21
2.6	Sommerekzemer-Decke	28
2.7	Toleranz Induktion durch regulatorische T-Zellen	35
3.1	OVA-Asthma-Protokoll	50
4.1	Pflaster-Therapie	75
4.2	Totale Zellzahl der BAL	76
4.3	Zelltypen der BAL	77
4.4	BAL Zytokine	80
4.5	LN Zytokine	82
4.6	Milz Zytokine	85
4.7	Lungenschnitte	88
4.8	Spontane und Physikalische Histaminfreisetzung	93
4.9	Allergenspezifische Histaminfreisetzung in den Ex- positionsmonaten	95
4.10	Allergenspezifische Histaminfreisetzung Winter	96
4.11	Epikutane Pflaster-Therapie am Pferd	99
4.12	Histaminwerte Studie 1, Therapieverlauf 2009	102
4.13	Klassifizierung Studie 1, Therapieverlauf 2008-2009	104

4.14	Histaminwerte Studie 2, Therapieverlauf 2010	107
4.15	Klassifizierung Studie 2, Therapieverlauf 2008-2010 .	109
4.16	Histaminwerte Studie 3, Therapieverlauf 2010	111
4.17	Klassifizierung Studie 3, Therapieverlauf 2009-2010 .	113

Tabellenverzeichnis

2.1	<i>Culicoides ssp.</i>	22
3.1	Pferderassenverteilung	43
3.2	Zellkulturmedium R10	43
3.3	Paraformaldehyd 4%	44
3.4	Ammoniumchlorid-Lösung 1,6%	45
3.5	Narkose Maus	45
3.6	Letale Narkose Maus	46
3.7	Pipes A	46
3.8	Pipes B	47
3.9	PBS mit 2% EDTA	47
3.10	<i>Culicoides nubeculosus</i> , Lyophilisat	48
3.11	Induktion OVA-Asthma-Modell	50
3.12	Utensilien zur Entnahme der BAL	52
3.13	Zytokin - ELISA	56
3.14	Symptom-Klassifizierung	65
3.15	Geräte 1	68
3.16	Geräte 2	69
3.17	Verbrauchsmaterial	70
3.18	Reagenzien	71
3.19	Arzneimittel	72
3.20	ELISA-Kit	72
4.1	Pferde 1	90
4.2	Pferde 2	91

4.3	Epikutane Toleranztherapie beim Pferd - Studienan-	
	sätze	98

Abkürzungsverzeichnis

Ak	Antikörper
Aqua dest	Aqua destillata (destilliertes Wasser)
APC	Antigen präsentierende Zellen
BAL	Bronchoalveolare Lavage
BfR	Bundesamt für Risikobewertung
BSA	Bovines Serumalbumin
CD	Cluster of Differentiation
<i>C. ssp.</i>	<i>Culicoides subspezies</i>
DETC	Dendritische epidermale T-Zellen (engl.: dendritic epidermal T cells)
DZ	Dendritische Zellen
EAE	Experimentelle allergische Enzephalomyelitis
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetra-Acetat
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay (Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest)
EPIT	Epikutane allergenspezifische Immuntherapie
Fc	Fragment crystallizable; durch Disulfidbrücken verbundene C-terminale Domänen (C2+C3 bzw. C2-C4) der konstanten Immunglobulinkette, ein Teilbereich dieses Ig-Fragmentes kann an Fc-Zellrezeptoren binden.
FcεRI	Fcε-Rezeptor I (hochaffiner Fcε-Rezeptor)
FCS	Fetales Kälberserum
FIT	Funktioneller in vitro-Test für Typ I-Allergien
FoxP	Forkhead box Protein

HA5	mit 5 μ g Allergen restimierte granulozytäre Zellen
HE	Hämatoxylin und Eosin-Färbung
hgr	hochgradig
HS	Unstimulierte granulozytäre Zellen, zur Bestimmung der spontanen Histaminfreisetzung
HP	Gekochte granulozytäre Zellen, zur Bestimmung der physikalischen Histaminfreisetzung
HR	Histamin Rezeptor
HRT	Histamine release test
IDT	Intradermal Testung
IFN	Interferon
Ig (IgG, IgE)	Immunglobulin, speziell IgG und IgE
IL	Interleukin
i.n.	intra nasal (in die Nase)
i.p.	intra peritonial (in die Bauchhöhle)
iTreg	induzierte regulatorische T-Zellen
LN	Lymphonodus (Lymphknoten)
MHC II	Major Histocompatibility Complex II
neg	negativ
NKT-Zellen	Natürliche T-Killerzellen
n.s.	nicht signifikant
nTreg	natürliche regulatorische T-Zellen
OVA	Ovalbumin (Hühnereiweiß)
PBS	Phosphate buffered saline (phosphatgepufferte Kochsalzlösung)
PD	Programmierter Zelltod, (programmed death)
p.i.	post injectionem
Pipes	Piperazine-N,N'-bis[2-ethanesulfonic]acid (Piperazin-N,N'-bis[2-ethansulfonsäure])
pos	positiv
RIA	Radioimmunassay
rpm	(englisch: revolutions per minute), Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur

SALT	Lymphsystem der Haut, englisch: Skin associated-lymphoid tissue
score	Maßzahl, Bewertungsziffer
SIT	Allergenspezifische Immuntherapie
SCIT	Subkutane allergenspezifische Immuntherapie
SLIT	Sublinguale allergenspezifische Immuntherapie
Th-Zelle	T-Helferzellen
Th1/Th2-Zelle	Subpopulationen von T-Helfer-Zellen
Tr1	regulatorische T-Zellen vom Typ 1
Treg	regulatorische T-Zellen
WHO	World Health Organisation
V	Vena

1 Einleitung und Zielsetzung

Allergien stellen im 21. Jahrhundert ein zunehmendes, gesundheitliches Problem dar. Man geht davon aus, dass mittlerweile jeder dritte Deutsche an einer Allergie leidet. Die WHO geht dabei noch einen Schritt weiter und meldet, dass Allergien ein globales Problem sind und weltweit die Hälfte aller Menschen davon betroffen ist: "Waren es im Jahr 1960 drei Prozent der Weltbevölkerung, die von einer Allergie betroffen waren, steigerte sich die Zahl bis 1995 auf etwa 30 Prozent. Die World Health Organisation (WHO) befürchtet einen Zuwachs binnen der kommenden fünf Jahre um weitere zehn bis 20 Prozent". Besonders steigt die Zahl der Jugendlichen, die an einer Allergie leiden. Nach einer Studie des Bundesamts für Risikobewertung (BfR) sind 40,8% aller untersuchten Kinder auf Nahrungsmittel- und Inhalative-Allergene sensibilisiert.

Es kommt aber nicht nur zur Zunahme der Allergien im humanmedizinischen Bereich, auch in der Veterinärmedizin wird ein Zuwachs an allergischen Patienten beobachtet. Es wird berichtet, dass mittlerweile jede zweite Hauterkrankung beim Hund auf eine Allergie zurückzuführen ist. Ebenso wird bei Katzen eine steigende Anzahl an Allergikern verzeichnet, hier vor allem gegen Futtermittel (WWW.ANIMAL-HEALTH ONLINE.DE (2010)). Ein Schwerpunkt dieser Arbeit konzentriert sich auf das sog. 'Sommerekzem' des Pferdes. Betroffene Pferde reagieren dabei auf den Speichel der Mücken der Gattung *Culicoides* (QUINN et al. (1983)) in Form von papulösen Erhebungen und starkem Juckreiz. Auch bei dieser Allergie ist eine stetig steigende Anzahl an Patienten zu erkennen.

Die Gründe für die Zunahme von Allergien sind unklar, werden

aber allgemein mit steigender Hygiene, verminderten Wurminfektionen und der stärkeren Verbreitung von künstlichen Substanzen in Verbindung gebracht (OKADA et al. (2010)). Es wird aber nicht nur an der weiteren Klärung der Ursache von Allergien geforscht, sondern auch an neuen therapeutischen Behandlungsstrategien. Die sog. SCIT (subkutane allergenspezifischen Immuntherapie), bei der das Allergen nach einem strengen Protokoll subkutan injiziert wird, ist im Moment die einzige verfügbare Therapie gegen Allergien. Der Erfolg der SCIT beim Menschen liegt zwischen 30% (Pollen) und 80% (Bienen) (MÜLLER et al. (2008)) und je nach Studienbetrachtung und Art der Diagnostik von unter 60% bis zu 71% beim Sommerexzem des Pferdes (LÖWENSTEIN und MÜLLER (2008)). Bei dieser Immuntherapie besteht das erhöhte Risiko eines anaphylaktischen Schocks durch Allergeninjektion in die Blutbahn. Diese Gefahr wird durch neuartige Therapieansätze, wie z.B. die sublingual Therapie (SLIT) minimiert. Diese Therapieform befindet sich noch in der klinischen Studie und ein Erfolg wird bisher sehr kontrovers diskutiert (FREW (2010)). Ein weiterer Ansatz ist die epikutane Immuntherapie (EPIT), die auch in dieser Arbeit angewandt wurde.

Epikutane Therapien sind bereits seit vielen Jahren eine übliche Form der Verabreichung von diversen Therapeutika. Bekannt ist in diesem Zusammenhang vor allem das Hormon-, Nikotin- oder auch Schmerzpflaster. Wie in der Abbildung 1.1 zu sehen, steigt die Anzahl der verschriebenen und verwendeten transdermalen Medikamente rasant.

Den reinen Wirkstoff-Applikationen über die Haut folgten erste Impfversuche in Amerika mit transdermalen Pflastern gegen Reise-diarrhoe, Influenza und Milzbrand (WWW.IOMAI.COM (2010)). Die Forschungs- und Zulassungsarbeiten dauern noch an, es ist aber absehbar, dass diese Art der Vakzinierung bald in den Arztpraxen in den USA verfügbar sein wird.

Große Fortschritte in der transdermalen Therapie sind aber nicht nur in der Immunisation zu erkennen, sondern auch in der Immuntherapie. In jüngster Zeit konnte die Arbeitsgruppe um Prof. Kündig

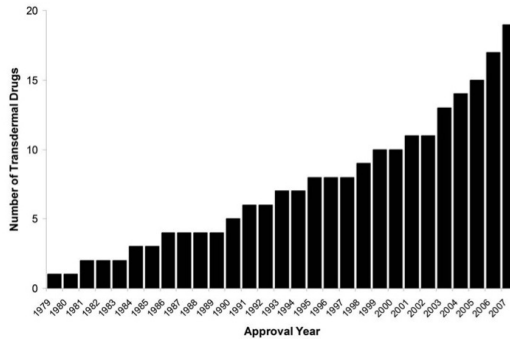


Abbildung 1.1 Transdermale Pflaster

Im Jahr 1979 wurde das erste Pflastertherapeutikum in den USA zugelassen. Mittlerweile sind 18 weitere transdermale Medikamente auf dem Markt, mit stetig steigenden Absatzzahlen, wie aus der Grafik zu entnehmen. Veröffentlichung der Grafik mit der freundlichen Genehmigung von npg, aus der Veröffentlichung von PRAUSNITZ und LANGER (2008)

aus Zürich im humanmedizinischen Bereich zeigen, dass es möglich ist Menschen mit Allergien durch eine EPIT zu therapieren (SENTI et al. (2009a)). Parallel zu den Allergie-Studien wurden die transdermalen Therapieversuche für diese Doktorarbeit durchgeführt. In dieser Arbeit wurde die EPIT an einem etablierten Maus-Modell angewandt (WOHLLEBEN et al. (2004)), bei dem experimentell eine Allergie gegen das Protein Ovalbumin (OVA) ausgelöst wurde. Diese experimentelle Hypersensitivität entspricht immunologisch der Typ I Allergie des Menschen und der als Typ I geltenden Allergie des Sommerkezems des Pferdes (QUINN et al. (1983)). Für die Untersuchung der EPIT unter Feldbedingungen wurde die Therapie auch an Pferden mit Sommerkezem durchgeführt.

Ziel dieser Arbeit war es eine EPIT am Mausmodell zu entwickeln und die mögliche Aktivierung von Toleranzmechanismen zu analysieren. Die gewonnenen Erkenntnisse wurden anschließend bei einer EPIT an Pferden mit Allergie umgesetzt. Dabei wurde sich speziell auf die Allergie gegen die *Culicoides*-Mücke, dem 'Sommerkezem'

1. Einleitung und Zielsetzung

konzentriert. Dies setzte einen sensitiven Allergietest voraus, der in dieser Arbeit auf dem Verfahren von KAUL (1998) basiert und weiterentwickelt angewandt wurde.

2 Literaturübersicht

2.1 Allergie

Bereits im Jahr 1833 publizierte ELLIOTSON (1833) in der London Medical Gazette eines der ersten Erkenntnisse über Asthma. Er stellte fest, dass asthmatische Anfälle saisonal bedingt sind und oft nur an bestimmten Orten ausgelöst werden können. Außerdem erkannte er einen Zusammenhang mit der damals publizierte Krankheit 'Hay fever' oder auch catarrhus aestivus genannt. Erst Jahrzehnte später stellte der Wiener Kinderarzt Clemens von Pirquet (1903) eine Verbindung zwischen den 'Fremdsubstanzen' und der 'veränderten Körperreaktion' fest (BERGMANN (2006)). Im 20. Jahrhundert ist die Allergie eine klare definierte Krankheit. Im klinischen Wörterbuch (PSCHYREMBEL (2002)) wird die Allergie als 'angeborene oder erworbene spezifische Änderung der Reaktionsfähigkeit des Immunsystems gegenüber körperfremden, eigentlich unschädlichen und zuvor tolerierten Substanzen, die als Allergen erkannt werden' bezeichnet.

Eine Überreaktion des Immunsystems auf harmlose Substanzen setzt eine Sensibilisierung voraus (GALLI et al. (2008b)). Diese kann bei einem ersten Kontakt mit einem potentiellen Allergen entstehen, da es hier zur Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses kommt. Bei erneuter Exposition mit der Substanz werden die allergischen Symptome ausgelöst (BÜTTNER et al. (2002), LOCKSLEY (2010)).

2.1.1 Allergietypen

Man unterscheidet fünf Typen einer allergischen Reaktion. Typ I - III und V werden als humorale, Antikörper vermittelte Hypersensitivität zusammengefasst, Typ IV gilt als Zell-vermittelte Allergie. Der Grundtyp I wird auch als Anaphylaxietyp, Soforttyp oder IgE-vermittelter Typ bezeichnet (BÜTTNER et al. (2002)). Bei einem Kontakt mit dem Allergen treten die Symptome der Allergie innerhalb von Sekunden bis Minuten auf. Es kann eine zweite allergische Reaktion nach 4-6 Stunden folgen (sog. verzögerte Reaktion). Voraussetzung sind gebundene IgE-Moleküle auf dem FcεRI - Rezeptor der Mastzellen und basophilen Granulozyten (GALLI et al. (2008a), HOGAN (2007)). Die IgE-Antikörper werden durch ein passendes Allergen quervernetzt. Dies löst die Ausschüttung verschiedener Mediatoren, wie z.B. Histamin aus. Freiwerdende Entzündungsmediatoren wie z.B. Leukotriene bewirken die verzögerte Form dieser Allergie. Das klinische Bild ist u.a. bei Menschen mit allergischen Asthma oder allergischer Konjunktivitis zu sehen und auch beim Sommerexzem des Pferdes (BÜTTNER et al. (2002), JUNGI et al. (2000), LOCKSLEY (2010)).

Bei Allergien vom zytotoxischen Typ, Typ II, kommt es zur Interaktion von IgM oder IgG-Antikörper mit körpereigenen, zellwandständigen Antigenen (JANEWAY et al. (2002)). Durch Aktivierung des Komplementsystems oder zytotoxischer Killerzellen wird eine Zellzerstörung durch Lyse oder Phagozytose ausgelöst. Besonders anfällig sind Erythrozyten und Thrombozyten, was zu einer allergisch bedingten hämolytischen Anämie, Thrombozytopenie oder beim Menschen auch zu einem Zwischenfall bei Transfusionen durch eine ABO-Blutgruppenunverträglichkeit führen kann (BÜTTNER et al. (2002), JUNGI et al. (2000)).

Die Typ III Allergie ist eine Immunkomplex-vermittelte Überempfindlichkeitsreaktion, die sowohl lokal am Ort der Antigen-Antikörper-Reaktion (Arthus-Reaktion) als auch systemisch durch zirkulierende Immunkomplexe (Serum-Krankheit) auftreten kann (JANEWAY

et al. (2002)). Bei dieser Hypersensibilität werden lösliche Antigen-Antikörper-Aggregate gebildet, die sich an Gefäßwänden oder an Geweben ablagern (BÜTTNER et al. (2002)). Dies führt zur Aktivierung des Komplementsystems und der folgenden Phagozytose der Immunkomplexe durch neutrophile Granulozyten unter Freisetzung gewebschädigender Enzyme (GELL und COOMBS (1968), PSCHYREMBEL (2002), PONVERT und SCHEINMANN (2003)).

Abgrenzend von den humoralen allergischen Reaktionen ist der Hypersensitivitäts-Typ V zu betrachten. Es kommt dabei zu einer funktionellen Störung, die durch die Antikörperbindung an zelluläre Rezeptoren ausgelöst wird. Die Symptome der Allergie entstehen hierbei nicht durch Entzündungsreaktionen, sondern durch die Beeinflussung der Funktionen durch die Antikörper gebundenen Strukturen (z.B. Rezeptoraktivierung). Bei der sog. Basedow-Krankheit kommt es z.B. zur Bildung von Autoantikörpern gegen den TSH-Rezeptor (Thyroidea stimulierendes Hormon). Aus diesem Grund wird kontinuierlich die Hormonproduktion stimuliert und eine Hyperthyreose provoziert, da die normale negative Rückkopplung über die Hypophyse wirkungslos bleibt (BÜTTNER et al. (2002)). Der Grundtyp IV ist der zellvermittelte, verzögerte Allergietyp, der vor allem von T-Zellen, Monozyten und Makrophagen ausgeführt wird. Sensibilisierte T-Zellen setzen bei Kontakt mit einem Antigen proinflammatorische Zytokine frei, was zur einer Entzündungsreaktion mit Aktivierung von Makrophagen und mononukleären Zellen führt, die an den Ort der Antigenbelastung wandern (JANEWAY et al. (2002)). Eine klassische Typ IV Reaktion ist die diagnostisch eingesetzte Tuberkulinreaktion. Es werden dabei Mykobakterienextrakte intrakutan injiziert und die Reaktion der Haut an der Applikationsstelle beobachtet. Hatte ein Individuum bereits Kontakt mit dem *Mykobakterium tuberculosis* oder dem Impfstoff und damit T-Gedächtnis-Zellen ausgebildet, kommt es nach 48 bis 72 Stunden zu einer Rötung und Schwellung am Injektionsort. Weitere Beispiele sind das allergische Kontaktekzem und das Arzneimittelexanthem (TORRES und BLANCA (2010), BÜTTNER et al. (2002), GELL und COOMBS (1968)).

2.1.2 Allergie vom Soforttyp (Typ I)

Der Schwerpunkt dieser Arbeit konzentrierte sich auf die Allergie vom Typ I, da sowohl das experimentell ausgelöste Asthma im Maus-Modell, als auch das Sommerekzem des Pferdes, als IgE-vermittelte allergische Reaktion gilt (QUINN et al. (1983), WOHLLEBEN et al. (2004)).

Die Typ I Allergie kann in drei Phasen unterteilt werden (VOLLMAR und DINGERMAN (2005)): Die Sensibilisierung, die Sofortreaktion und die Spätreaktion.

Laut GALLI et al. (2008b) können mehrere Faktoren eine Sensibilisierung begünstigen. Zum einen wird eine erbliche Komponente diskutiert. Ebenso scheint die Zusammensetzung, die Konzentration und die Verbindungen des Allergens mit weiteren Antigenen (z.B. Dieselpartikel, Feinstaub) bei der Sensibilisierung eine Rolle zu spielen. Darüber hinaus existiert die Hygiene-Hypothese, die besagt, dass durch die stetige Desinfektion, das Schaffen einer möglichst keimfreien Umgebung und durch mangelnde parasitäre Infektionen das Immunsystem nicht mehr ausgelastet ist und stärker zu allergischen Reaktionen neigt (OKADA et al. (2010)). Bei JANEWAY et al. (2002) wird beschrieben, dass die meisten Allergene sehr kleine, meist sehr gut lösliche Proteine sind, die auf trockenen Partikeln, wie z.B. Milbenkot oder Pollenkörnern transportiert werden können. Kommt das potentielle Allergen auf diese Weise in Kontakt mit der Schleimhaut, löst es sich und diffundiert in die Schleimhaut. Es folgt die Phagozytose dieses Antigens durch Antigenpräsentierende Zellen (APC) wie z.B. Dendritische Zellen (DZ). In der Abbildung 2.1 ist grafisch dargestellt, wie potentielle Allergene von DZs aufgenommen werden. Die DZ wandert damit zum nächstgelegenen Lymphknoten und präsentiert das Antigen naiven T-Zellen über MHC-II Moleküle. Aber nicht nur DZs fungieren als APCs. Jüngste Erkenntnisse zeigen, dass basophile Granulozyten im

Bezug auf Wurm-Infektionen und Allergien die potenteren 'Antigen-Präsentierer' sind (NAKANISHI (2010)). Kommt es neben der Präsentation des potentiellen Antigens zur Ausschüttung des Interleukins IL-4 verschiedenster Zelltypen, wie den Eosinophilen, Basophilen, Mastzellen oder den natürlichen T-Killerzellen (COMMINS et al. (2010), STONE et al. (2010)), erlangt die naive T-Zelle T-Helfer 2 (Th2) Eigenschaften. Auch Epithelialzellen können zur Aktivierung von Th2 Zellen und den jüngst publizierten Nuocytes durch das Freisetzen von IL-25, IL-33 und Thymusstroma Lymphopoietin führen (BULEK et al. (2010), NEILL et al. (2010)). NEILL et al. (2010) beschreiben die stimulierten Nuocytes als erste Quelle für die Sezernierung von IL-13. Th2 Zellen schütten ebenfalls das Zyklin IL-13, aber auch IL-4 aus (COMMINS et al. (2010)). Diese Interleukine und weitere stimulierende Moleküle führen zum sog. Isotypenwechsel der B-Zelle und damit zur Freisetzung von IgE Molekülen. Der Wechsel zur IgE Produktion kann allerdings nur stattfinden, wenn auch der B-Zell-Rezeptor in Kontakt mit dem Antigen gekommen ist (VOLLMAR und DINGERMAN (2005)). Bewirkt ein Antigen den Isotypenwechsel zur IgE-Produktion spricht man von einem Allergen. Die freigewordenen IgE Moleküle diffundieren im lymphatischen System und können sich hochaffin und ohne weitere Stiumuli an den FcεRI Rezeptor der Mastzellen, basophilen und aktivierten eosinophilen Granulozyten binden. Zu diesem Zeitpunkt sind keine klinischen Symptome ersichtlich (JANEWAY et al. (2002)).

Bei einem wiederholten Kontakt mit dem Allergen, kommt es zur Kreuzvernetzung der gebundenen IgE Moleküle auf Mastzellen und basophilen Granulozyten und damit zur Degranulation und Freisetzung verschiedenster Mediatoren, aber auch erneut zur Sensibilisierung weiterer Immunzellen. Nach Sekunden bzw. wenigen Minuten sind die Symptome der Sofort-Reaktion auszumachen. Verantwortlich dafür sind primäre und sekundäre Mediatoren (GALLI et al. (2008b)). Zu den Primären gehört u.a. Histamin, welches zu einer sofortigen Vasodilatation, Muskelkontraktion, zu einer Erhöhung der Gefäßpermeabilität und final zu einer Steigerung der lokalen

Durchblutung führt. Des weiteren zählen Enzyme, wie die mastzellspezifische Chymase, Tryptase und Serinesterase zu der Gruppe der primären Mediatoren (JANEWAY et al. (2002)). Werden diese freigesetzt, aktivieren sie die Metalloproteasen der Bindegewebsmatrix, die eine gewebeschädigende Wirkung durch den Abbau von Matrixproteinen verursachen. Sog. sekundäre Mediatoren bewirken ähnlich wie das Amin Histamin eine erhöhte Gefäßdurchlässigkeit, Muskelkontraktion und Vasodilatation (JANEWAY et al. (2002), GALLI et al. (2008b)). Zu der Gruppe der sekundären Mediatoren gehören Chemokine, Leukotriene, PAF (platelet activating factors) und weitere Lipidmediatoren (KALESNIKOFF und GALLI (2008)). Diese Mediatoren werden nach Aktivierung der Mastzellen von Mastzellen synthetisiert. Die Freisetzung der Zytokine IL-4 und IL-13 durch Th2 Zellen führt schließlich zur Aufrechterhaltung der allergischen Reaktion (HAMMAD und LAMBRECHT (2008)). Laut STONE et al. (2010) sezernieren auch Basophile die Zytokine IL-4 und IL-13. Damit besitzen Basophile nicht nur Mastzellen-ähnliche Funktionen im Blut, sondern auch Th2-Eigenschaften. Des weiteren werden Eosinophile und Basophile über die Ausschüttung von IL-33, aus der IL-1 Superfamilie, direkt durch Mastzellen aktiviert (AKDIS (2009)). Den selben Effekt in Bezug auf Eosinophile wird durch die IL-5 Sekretion der Th2 Zellen ausgelöst. Residente Mastzellen führen zur Produktion von weiteren persistierenden Mediatoren und zur Aktivierung von Leukozyten (AKDIS und AKDIS (2009b)). Diese zuletzt beschriebenen Mechanismen sind verantwortlich für das Auslösen der Spätreaktion 3-8 Stunden nach dem Allergen-Kontakt (JANEWAY et al. (2002), GALLI et al. (2008b)).

Eine weitere Analyse der Zytokine der Th2 Zellen zeigt den direkten Einfluss dieses T-Zelltypes auf das Gewebe. So werden durch IL-9 die glatte Muskulatur, durch IL-13 die Keratinozyten und durch IL-31 die Epithelzellen moduliert (SCHMIDT-WEBER et al. (2007)). Neueste Forschungen lassen vermuten, dass auch Th17 Zellen einen Einfluss auf allergische Reaktionen haben. Es ist bekannt, dass dieser T-Zelltyp für das verstärkte Vorkommen und das Überleben von

neutrophilen Granulozyten am betroffenen Organ, für den Gewebeerabbau und für die Induktion zur Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen verantwortlich ist (SCHMIDT-WEBER et al. (2007)). Aus diesem Grund nimmt man an, dass Th17 Zellen unter anderem am Fortschreiten und Verschlechtern der Symptome einer Allergie beteiligt sind (BOUSQUET et al. (2007)).

Die 3 Phasen der Typ-I-Überempfindlichkeitsreaktion

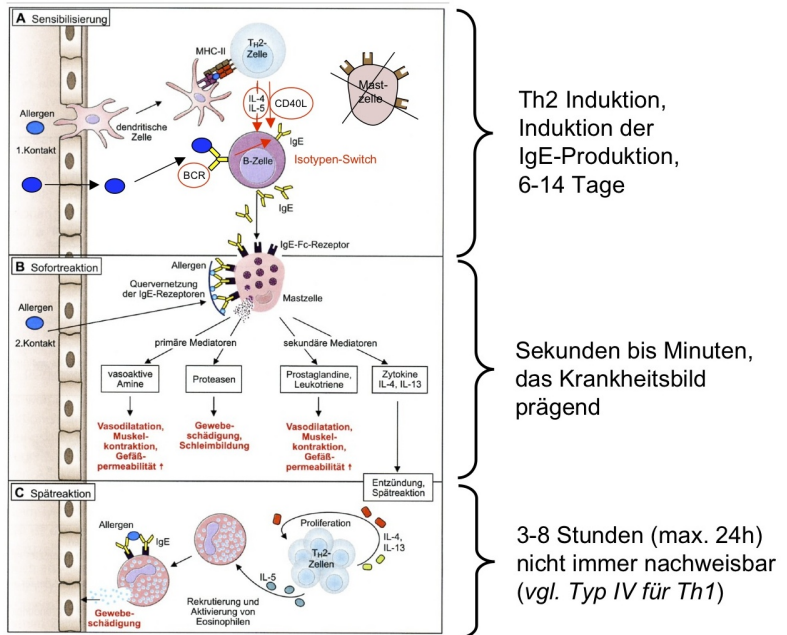


Abbildung 2.1 Typ I Allergie
VOLLMAR und DINGERMANN (2005)

Eine allergische Reaktion setzt stets eine Sensibilisierung voraus, bei der es zur Produktion von allergenspezifischen IgE Molekülen kommt. Diese Moleküle binden sich an den sog. FcεRI Rezeptor. Kommt es zu einem Zweitkontakt mit dem Allergen, werden die IgE-Globuline vernetzt und es kommt zur Ausschüttung primärer und sekundärer Mediatoren. Diese sind verantwortlich für die Symptomatik der Allergie und für das Auslösen der Spätreaktion.

Darstellung des Schemas der drei Phasen der Typ I Allergie nach freundlicher Genehmigung vom WVG aus dem Buch 'Immunologie: Grundlagen und Wirkstoffe' von A. Vollmar, T. Dinger- mann, Stuttgart 2005; Modifizierung von Prof. Manfred Lutz.

Typ I Allergie ausgelöst im Maus-Modell

Für die Erforschung der immunologischen Grundlagen einer Typ I Allergie und für die Entwicklung von Therapien gegen diese Erkrankung wurde ein Maus-Modell entwickelt. Gut etabliert ist in diesem Zusammenhang das Maus-Asthma Modell. Die Versuchsmäuse werden dazu auf das lösliche Protein OVA sensibilisiert. Als Adjuvant dient Aluminiumhydroxid (Alum). Kommt es bei den Mäusen zu einem Zweitkontakt mit dem Allergen durch intranasale (i.n.) Injektionen oder mit Hilfe eines Inhalators, entwickeln sie eine Th2 Immunantwort in Form des allergischen Asthmas (WOHLLEBEN et al. (2004)). Analytisch lassen sich bei diesen Tieren klassische, dem Menschen ähnliche allergische Symptome nachweisen. Bei einer histologischen Untersuchung der Lunge als betroffenes Organ sind die typischen Anzeichen der Allergie zu sehen. Beispiele sind die Metaplasie der Becherzellen im Bronchialepithel, die starke Schleimansammlung in den Bronchien und die peribronchiale und perivaskuläre Ansammlung von Entzündungszellen, wie Eosinophile und Lymphozyten (HAMMAD und LAMBRECHT (2008)). Messungen des Atemwegswiderstandes bei asthmatischen Mäusen ergeben eine deutliche Reduktion des Lungenwiderstandes, was unter anderem von CAMPBELL et al. (2009) gezeigt wurde. In der Bronchoalveolaren Lavage (BAL) sind zytologisch Eosinophile zu sehen - ein diagnostischer Hinweis auf ein allergisches Geschehen. Ebenso sind in der BAL und im Serum allergenspezifisches IgE und erhöhte Werte der Th2-Zellen typischen Zytokine IL-13, IL-5 und IL-4 zu detektieren (HAHN et al. (2003), GALLI et al. (2008b)). Werden die Milzzellen und die drainierenden Lymphknotenzellen der Lunge mit dem Allergen OVA restimuliert, können die Zytokine IL-13, IL-5 und IL-4 allergenspezifisch nachgewiesen werden (LAMBRECHT (1996)). Zusammengefasst wird deutlich, dass das Maus-Asthma Modell klinisch und symptomatisch dem allergischen Asthma des Menschen entspricht und damit der Typ I Allergie zuzuordnen ist (HAMMAD und LAMBRECHT (2008)). Für die Durchführung einer

epikutanen Toleranzinduktion ist das Modell somit geeignet, um die prinzipiellen Wirkmechanismen einer derartigen Therapie testen zu können.

Typ I Allergie beim Sommerkezem des Pferdes

Im Jahr 1978 wurden erste Untersuchungen an Pferden mit allergischen Symptomen, bei sog. 'Sommerkezern' von BAKER und QUINN (1978) publiziert. Sie injizierten diesen Pferden Extrakte verschiedener Mückenarten unter die Haut und konnten sowohl bei der Spezies *Culicoides ssp.*, als auch vereinzelt bei *Stomoxys calcitrans* eine Reaktion der Haut messen. Histologisch war ein subepidermales Ödem und eine Eosinophilie zu erkennen. Im Jahr 1983 zeigten QUINN et al. (1983), dass es möglich ist eine allergische Hautreaktion bei gesunden Pferden auszulösen, wenn sie zuvor Serum von allergischen Pferden erhalten hatten. Dies bestärkte die Vermutung, dass es sich beim Sommerkezem um eine Typ I Überempfindlichkeitsreaktion handelt. Es folgten Untersuchungen von QUINN et al. (1983) und FADOK und GREINER (1990) die zeigten, dass die Mücke der Gattung *Culicoides ssp.* hauptverantwortlich für die Symptome des Sommerkezems ist. Im Jahr 2001 wiesen VAN DER HAEGEN et al. (2001) Eosinophile, Zellen mit IgE-Antikörpern und Mastzellen in einer Hautbiopsie von Sommerkezern nach. MARTI et al. (1992) veröffentlichten, dass es bei diesen Pferden zu einer erhöhten Expression von Th2 Zytokinen kommt. 2006 bewiesen WAGNER et al. (2006a), WAGNER et al. (2006b), die Anwesenheit und die entscheidende Rolle von IgE bei Sommerkezemer-Pferden. Somit war zum einen die Ätiologie dieser Krankheit des Pferdes geklärt, als auch der immunologische Hintergrund. Dennoch lässt es sich nicht ausschließen, dass beim chronischen Stadium dieser Erkrankung auch andere immunologische Mechanismen eine Rolle spielen, wie z.B. die Typ IV Allergie (3RD HAVEMEYER WORKSHOP et al. (2007)).

Heutzutage sind weitere Typ I Allergien beim Pferd bekannt: der anaphylaktische Schock, die chronische obstruktive Bronchitis und auch die Urtikaria (KAUL (1998), JUNGI et al. (2000)).

2.2 Das Sommerekzem

Prinzipiell ist jedes Pferd, unabhängig von Alter, Geschlecht, Rasse und Fellfarbe anfällig für das Entwickeln der allergischen Erkrankung 'Sommerekzem' (RÜSBÜLDT (2007)). Mehrfach wurden erbliche Komponenten geprüft, die aber bis heute nicht vollständig geklärt sind (ERIKSSON et al. (2008)).

Die Symptome der Allergie sind vor allem im Gesicht, am Mähnenkamm, an den Ohren (Abb. 2.2), am Schopf, dem Widerrist, der Kruppe, unter dem Bauch (Bauchnaht, Euter, Genitale) und an der Schweifrübe zu erkennen (GEIBEN (2003), BJÖRNSDOTTIER et al. (2006)).



Abbildung 2.2 Folgen des Juckreizes beim Sommerekzem

Durch das Jucken an der Ohrmuschel und dem Gesicht ist das Fell abgeschabt. Zudem ist eine Schwellung des Ohres zu erkennen.



Abbildung 2.3 Symptome des Sommerkermes

Das Pferd hat sich die gesamte Schweifruebe frei gekratzt. Man spricht hier vom sog. 'Rattenschweif'.

Meist beginnen die Symptome mit papulösen Erhebungen im Bauchbereich, der Schulter und auf der Rückenlinie bzw. mit einer Schwellung der Bauchnaht (RÜSBÜLDT (2007), GERBER et al. (1994)). Nach Rückgang der ersten klinischen Anzeichen beginnt der Juckreiz mit der damit einhergehenden Unruhe. Die Pferde kratzen sich an den Körperregionen, die von der *Culicoides* Mücke zur Blutmahlzeit angeflogen wurden. Dies sind vor allem Bereiche, die nicht durch Schweifschlagen, Huftritte oder Bisse erreicht werden können. Außerdem kann beobachtet werden, dass *Culicoides ssp.* nicht an Hautstellen mit Haarwirbeln zusticht (RÜSBÜLDT (2007)). Alle weiteren Symptome sind Folgen des Juckreizes. Das Fell wird abgerieben, das Mähnenhaar ausgedünnt und der Schweif an der Ruebe kahl geschauert (sog. "Rattenschweif"; siehe Abb. 2.3). Die Hautdicke nimmt als Folge des Kratzens zu (Pachydermie) und legt sich am Mähnenkamm und am Widerrist in Falten (GEIBEN (2003)).

Diese Falten können sich zusammenlegen, luftdicht verschließen und so einen geeigneten Raum zur Vermehrung für Mikroorganismen bieten. Es kann aber nicht nur im Mähnen- und Schweifbereich zu sekundären Entzündungen kommen, sondern auch in den wundgescheuerten Hautbereichen. Nicht selten sind dort Bakterien und auch Pilzinfektionen nachzuweisen. In diesem Stadium kann es auch zu ulzerierenden Geschwüren kommen. Mit dem Ende des Mückenfluges beginnt schließlich die Regenerationsphase der Haut. Es kommt nur noch vereinzelt zu Juckreiz, was evtl. mit der Heilung der Wunden bzw. dem Nachwachsen des Felles einhergeht (RÜSBÜLDT (2007), GEIBEN (2003)).

Mit diesem Hintergrund scheint es interessant das Allergen genauer zu betrachten und den Stand der Wissenschaft im Bereich der Allergiediagnostik und -therapie zu erfassen.

2.2.1 Das Allergen: Der Speichel der *Culicoides* ssp.

Biologie und Verbreitung von *Culicoides* ssp.

Die Mücke der Gattung *Culicoides* ssp. gilt als Hauptverursacher der Symptome des Sommerkezems (QUINN et al. (1983)). Der Systematik nach gehören die Mücken zu den Gliederfüßern (*Arthropoda*), in die Familie der *Ceratopogonidae* (Gnitzen) und werden der Ordnung der *Dipterida* (Zweiflügler) zugezählt. Es sind mittlerweile über 1000 verschiedene Arten und Unterarten von *C.* beschrieben. Das Verbreitungsgebiet erstreckt sich dabei weltweit von den Tropen bis zur Subarktis. Es gibt nur wenige Ausnahmen, wie z.B. Island, wo diese Mücke nicht aufzufinden ist. Die im Mittelmeerraum vorkommenden Gnitzen sind meist dämmerungsaktive Mücken mit relativ kleinen (1,5-4mm), plumpen Körper (siehe Abb: 2.4) und gefleckten Flügeln (ROMMEL et al. (2000)).

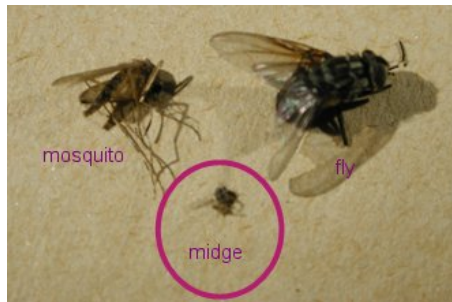


Abbildung 2.4 *Culicoides ssp.* im Größenvergleich

Culicoides ssp. im Größenvergleich zu einem Mosquito und einer Stuben-Fliege (*Musca domestica*). Darstellung nach freundlicher Genehmigung von Wendy van Loon, Intervet/Schering-Plough Animal Health.

Während sich männliche Tiere alleine von Pflanzensäften ernähren, sind weibliche Tiere hämatophag und benötigen die Blutmahlzeit zur Eiablage. Die Eiablage der Tiere erfolgt stets in den warmen Jahreszeiten auf Wasserpflanzen in stehenden Gewässern, unter morscher Rinde, unter Steinen, in Laub u.ä.. Die Larven entwickeln sich aquatisch am Gewässerrand oder an Land unter faulenden organischen Material. (z.B in Dung, Mist- oder Komposthaufen) (ROMMEL et al. (2000)). Nach Durchlaufen von vier Larvenstadien und einer Mumienpuppe schlüpft die Mücke nach ca. 23 Tagen.

C. legum legen in der Regel nur wenige hundert Meter an Flugstrecke zurück. Lediglich geeigneter Wind lässt sie mehrere Kilometer weg von ihrem Geburtstort entfernen (ROMMEL et al. (2000)).

Für die Blutmahlzeit der weiblichen Tiere werden Säuger und Vögel aufgesucht. Je nach *C. Art* variiert der Wirt und die Einstichlokalisation (BRAVERMAN (1988)). Durch das Saugen von Blut spielen die Gnitzen nicht nur eine Rolle als Allergenträger, sondern auch als Überträger von Protozoen, Filarien, Bakterien und Viren (ROMMEL et al. (2000)). Besonders der Virus der Blauzungenkrankheit, der

mittlerweile endemische Ausmaße in der Rinderhaltung (subklinischer Verlauf) und der Schafzucht (klinischer Verlauf) nicht nur in Südafrika und Südeuropa, sondern auch in Zentraleuropa angenommen hat, sei in diesem Zusammenhang erwähnt (MEHLHORN et al. (2009)).

Durch Studien, die in Verbindung mit der Blauzungkrankheit über die Verbreitung der *C. Mücke* in Deutschland durchgeführt wurden, sind die deutschlandweit vorkommenden Arten identifiziert. Mit einer Häufigkeit von 70% wurden Mücken der *C. obsoletus* Gruppe gefunden und mit 20% *C. pulcaris*. Die restlichen 10% waren von etwa 24 Unterarten (MEHLHORN et al. (2009)). Bei einer gezielten Spezies-Untersuchung im Nordwesten Deutschlands konnte festgestellt werden, dass dort *C. pulcaris* im Sommer mit einer Häufigkeit von bis zu 90% aufzufinden war. In geringerer Anzahl konnte *C. obsoletus* identifiziert werden, die auch im Januar und Februar aktiv vorzufinden waren (KIEL et al. (2009)). Im Südwesten Deutschlands dominierte *C. scoticus* mit 36-76%. Am zweithäufigsten wurde *C. obsoletus* aufgefunden (BALCZUN et al. (2009)). Die Identifizierung von *C.* in Bayern wurde von HÖRBRAND und GEIER (2009) durchgeführt. Es stellte sich heraus, dass 83% der identifizierten Mücken der Spezies *C. obsoletus* angehören, 10% zu *C. pulcaris* und 3% zu anderen *C. Spezies*.

Unterscheiden kann man *C.* an der Morphologie der Flügel, wie in Abbildung 2.5 zu sehen. Zusätzlich ist *C. nubeculosus* dargestellt. Diese Spezies wird erfolgreich in Menschenhand nachgezüchtet, ist in Deutschland aber nicht verbreitet. Die Art ist die einzige als Ganzkörperextrakt kommerziell erhältliche Spezies. Sie wird standardmäßig sowohl für die Diagnostik, als auch für die Immuntherapie verwendet.

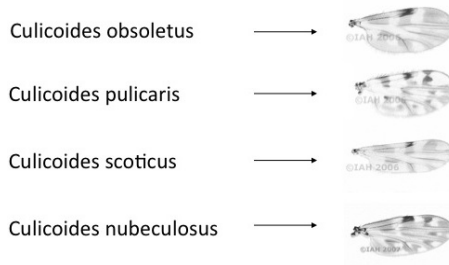


Abbildung 2.5 *Culicoides* ssp.

Darstellung der Flügel als morphologisches Unterscheidungsmerkmal verschiedener *C.* Arten. Zu sehen ist *C. obsoletus*, die mit 70% den Großteil der Gnitzen in Deutschland ausmacht. *C. pulicaris* ist zu 20% vertreten. *C. scoticus* wurde gehäuft nur in Südwesten Deutschlands gefunden und dort mit bis zu 76%. *C. nubeculosus* wurde bisher in Deutschland nicht identifiziert, ist aber als einzige Art kommerziell verfügbar.

Die Darstellung der morphologischen Merkmale wurde freundlicher Weise von Eric Denison, Institute for Animal Health, Pirbright (www.Culicoides.net) genehmigt.

Das Allergen von *Culicoides* ssp.

Die Stiche, die weibliche *C.* setzen um ihre Blutmahlzeit zu erhalten, können nicht nur beim Pferd allergische Reaktionen hervorrufen, sondern auch bei Eseln, Schafen und Rindern, sowie beim Menschen (YERUHAM et al. (1993)). Als Zeichen einer allergischen Überreaktion gegen *C.* sind massive Hautreaktionen beschrieben. Im Gegensatz zur 'normalen' Reaktion auf Stiche, wie Rötung, Schwellung und Schmerzhaftigkeit an der Einstichstelle (LANGNER (2005)) kommt es zu starkem Juckreiz und bei Tieren zu daraus folgendem Fell-, Mähnen-, Schweifverlust und offenen Wunden. Bereits 1973 erbrachte die Forschung von MCCAIG (1973) erste Hinweise, dass Gnitzen an der allergischen Reaktion bei Pferden beteiligt sind. Mittlerweile sind die Arten von *C.* identifiziert, die eine Allergie bei Pferden auslösen können (Tabelle: 2.1). Darüber hinaus konnte bei einer intra dermal Testung gezeigt werden, dass Sommerkzemer-Pferde

2. Literaturübersicht

positiv auf verschiedenste *C. Spezies* reagierten, unabhängig ob diese Mücke in der Umgebung vorkam oder nicht (ANDERSON et al. (1993), LANGNER et al. (2008)). Dies ermöglicht die Verwendung der einzigen kommerziell erhältlichen *C. Spezies* (*C. nubeculosus*). Diese ist in Deutschland nicht verbreitet und kann somit trotzdem für die Diagnostik und die Immuntherapie herangezogen werden.

Tabelle 2.1 *Culicoides ssp.*

Referenz	Spezies
MORROW et al. (1986)	<i>C. pulicaris</i>
HALLDORSÐOTTIR et al. (1989)	<i>C. chiopterus</i> , <i>C. obsoletus</i> , <i>C. impuctantus</i>
ANDERSON et al. (1993)	<i>C. obsoletus</i> , <i>C. cockerellii</i> , <i>C. imicola</i> , <i>C. biguttatus</i> , <i>C. sonorensis</i> (ehemals <i>C. variipennis</i>)
GREINER et al. (1990)	<i>C. insignis</i> , <i>C. stellifer</i> , <i>C. niger</i> , <i>C. akchua</i> , <i>C. scanloni</i> , <i>C. pusillus</i> , <i>C. edeni</i>
KAUL (1998)	<i>C. nubeculosus</i> , <i>C. sonorensis</i>

Aufstellung der *C.-Spezies*, die Überreaktionen beim Pferd auslösen können. Getestet wurden Ganzkörperextrakte, die intrakutan injiziert oder in einem in-vitro Verfahren getestet wurden. Aufstellung nach LANGNER (2005).

Um die Spezifität und Sensitivität der Diagnostik und der Therapie erhöhen zu können, arbeiten verschiedenste Arbeitsgruppen an der Identifizierung und der rekombinanten Herstellung der Hauptallergene (3RD HAVEMEYER WORKSHOP et al. (2007)). MARTI et al. (1999) postulierten, dass vor allem im Speichel der *C.* das Allergen zu finden sei. Darüber hinaus wurde eine Allergenizität von Ganzkörperextrakten männlicher Tiere und von Larven der Spezies *C. nubeculosus* gezeigt, die eine kaum entwickelte Speicheldrüse besaßen (MARTI et al. (1999), ALTHAUS et al. (2004)). Die Bedeutung des Speichelsekretes im Zusammenhang mit dem Sommerexzem wurde schließlich von WILSON et al. (2008) gezeigt. In immunhistologischen Versuchen mit Serumglobulinen von Pferden an *C. ssp.* konnten sie verdeutlichen, dass sich die höchste Konzentration an nachweisbaren IgE- und IgG- bindenden Komponenten in der Speicheldrüse der Mücke befindet. Es konnten aber auch Antikörper bindende Substanzen im Zytoplasma von Zellen im

hinteren Abdomen, im gangliösem Nervensystem und im Auge nachgewiesen werden. Diese Resultate weisen erneut daraufhin, dass die Allergene nicht nur im Speichel der Mücke lokalisiert sind und das Ganzkörperextrakte sowohl als Testsubstanz im in-vitro Verfahren, als auch bei einer Spezifischen Immuntherapie verwendet werden können.

Trotz dieser Ergebnisse wäre ein rekombinant hergestelltes Allergen ein großer Fortschritt in der Wissenschaft, der Diagnostik und der Therapie des Sommererkzems.

2.2.2 Die Diagnostik des Sommererkzems

Die Anzahl der verfügbaren Diagnostika im Bezug auf das Sommererkzem sind in den letzten Jahren enorm gestiegen. Es lassen sich dabei verschiedene Ansätze unterscheiden:

1. Die intradermal Testung (IDT) als in vivo Verfahren
2. Die in vitro Messung des allergenspezifisch freigesetzten Histamins (HRT)
3. Die in vitro Erfassung der allergenspezifisch freigesetzten Sulfidoleukotriene (CAST®)
4. Serologische Messung der equinen allergenspezifischen Antikörper im ELISA (z.B. FcεRI-Test)

Bei einem direkten Vergleich der Testverfahren 1, 2 und 4 zeigten LANGNER et al. (2008), dass vor allem der IDT und der HRT exaktere Ergebnisse lieferten, als das serologische Verfahren. Von KOLM-STARK und WAGNER (2002) und im 3RD HAVEMEYER WORKSHOP et al. (2007) wurden alle vier Tests verglichen und es stellte sich

eine gute bis mittelmäßige Übereinstimmung der in-vitro Verfahren heraus. Wissenschaftler im 3RD HAVEMEYER WORKSHOP et al. (2007) fassten zusammen, dass die momentan verfügbare Diagnostik für das Sommerekzem gute bis moderate Ergebnisse liefern, die durch hochaffine IgE Moleküle und durch reine Allergenextrakte (rekombinant) verbessert werden könnten.

Die IDT

Bei der IDT wird dem Pferd eine etwa 30 cm x 15 cm große Fläche an der dorsolateralen Halsseite rasiert und mit Alkohol desinfiziert. Je nach Fragestellung wird der jeweilige Allergenextrakt in die Haut injiziert und die Injektionsstelle mit einem Permanentmarker gekennzeichnet. Anschließend soll die allergische Hautreaktion auf das jeweilige Allergen gemessen werden. Dabei wird die Aktivierung der lokalen Mastzellen ausgenutzt, die bei Allergenkontakt primäre und sekundäre Mediatoren freisetzen und es zu einer Rötung und Schwellung an der Allergenkontaktstelle kommt (HALLDORS-DOTTIR et al. (1989), FADOK und GREINER (1990), FERROGLIO et al. (2006), LANGNER et al. (2008)).

Nach der Allergenapplikation wird die Hautreaktion nach 30 Minuten, 4 Stunden und 24 Stunden p.i (post injectionem) gemessen (KOLM-STARK und WAGNER (2002)). LANGNER et al. (2008) demonstrierten, dass der IDT vor allem nach 30 Min. p.i. verlässliche Ergebnisse für den C. Ganzkörperextrakt liefert und 4 Stunden p.i. für den C. Speichel-Extrakt. Der 24-Stunden Wert spiegelt die Spät-Reaktion wieder.

Probleme ergaben sich vor allem durch die Invasivität dieser Diagnostik. Nach 4 Stunden waren nicht nur die Reaktion auf das Allergen ersichtlich, sondern auch die Inflammationsreaktion auf die Injektionen. Dies erschwerte die Unterscheidung zwischen Sommerekzemern und allergiefreien Pferden. Außerdem ist von HALLDORS-DOTTIR et al. (1989) bekannt, dass vor allem Sommerekzemer

mit milden Symptomen im IDT gehäuft falsch negative Ergebnisse liefern. Hinzu kommen die Erkenntnisse von HAMPEL (2007), dass die Mastzellen bei Pferden nicht gleichmäßig unter der Haut verteilt sind und eine Allergeninjektion an einer anderen Stelle ein anderes Ergebnis ergeben kann.

Messung des allergenspezifisch freigesetzten Histamins (engl. 'Histamine Release Test', 'HRT')

Die biologische Grundlage für den HRT sind basophile Granulozyten. An ihrem FcεRI Rezeptor kann sich IgE binden. Kommt es zu einem Allergenkontakt, verbinden die Allergene die allergenspezifischen, gebundenen IgE Antikörper und es wird unter anderem Histamin freigesetzt. Dieses Histamin kann in verschiedenen Verfahren quantifiziert werden. Im funktionalen in-vitro Test (FIT-Test) von KAUL (1998) und auch bei LANGNER et al. (2008) wird das Histamin im Radioimmunassay (RIA) erfasst. WAGNER et al. (2008) führten den Test mittels Histamin ELISA durch, wie es auch in dieser Dissertation angewandt wurde. LANGNER et al. (2008) zeigten, dass der HRT bei allergiefreien Tieren zu falsch positiven Ergebnissen führte. Eine Erklärung könnte die subklinische Sensibilisierung der allergiefreien Tiere gegen die *Culicoides* Mücke sein. Evtl. zeigen diese Pferde in den kommenden Jahren nach dem Test selbst allergische Symptome. Im Gegensatz dazu konnten keine falsch positiven Ergebnisse bei der Verwendung des C. Speichalextraktes evaluiert werden, was als Indiz für eine unspezifische Reaktion bei der Verwendung von Ganzkörperextrakten gewertet werden könnte.

Messung der allergenspezifisch freigesetzten Sulfidoleukotriene (CAST®)

Das sog. CAST® Verfahren ist ein zellulärer, antigenspezifischer Stimulationstest (cellular Antigen Stimulation Test). Prinzipiell ist er dem HRT Test gleichzusetzen. Es werden ebenfalls basophile Granulozyten mit dem Allergen stimuliert und anschließend anstelle des Histamins die synthetisierten Sulfidoleukotriene im ELISA gemessen (DGAKI et al. (2009)). Die Firma Laboklin verkauft den Test als saisonunabhängige Diagnostik. BASELGIA et al. (2006) veröffentlichten ganzjährige CAST® Untersuchungen von Sommerrekzemerpferden und konnte eine saisonale Abhängigkeit zeigen.

Serologische Diagnoseverfahren (z.B. FcεRI-Test)

Das serologische Verfahren basiert auf der Hypothese, dass allergische Individuen einen höheren allergenspezifischen Titer entwickeln als nicht-allergische (MIMURA et al. (2004)) und weist den IgE-Titer gegen ein bestimmtes Allergen via ELISA im Blut-Serum nach. Bei dem ELISA wird das zu testende Allergen als Trägersubstanz verwendet und an den Boden der ELISA-Platten gebunden. Es dient der Bindung von allergenspezifischem IgE und IgG im Serum. Die Detektion der IgE-Moleküle wird durch die Zugabe eines Fcε-Rezeptors durchgeführt. Ein Farbstoff markiert anschließend den gebundenen Rezeptor (WAGNER (2005)). Eine Variation zu diesem Test brachte die Forschung von WAGNER et al. (2003), die einen murinen, monoklonalen, pferdespezifischen Antikörper entwickelten. Diesen Antikörper verwendeten auch LANGNER et al. (2008). Sie zeigten, dass diese Variante des Tests eine sehr geringe Sensitivität aufweist. Gesteigert werden konnte dies durch die Aufreinigung der Immunglobuline im Serum. Eine native Serum-Messung ergaben

Titer unter dem detektierbaren Bereich. LORCH et al. (2001) verwendeten im serologischen Verfahren einen rekombinanten humanen Fc ϵ -Rezeptor (α Kette) und auch polyklonale equine IgE Antisera. Als Resultate ergaben sich eine 15-17% Quote an falsch positiven und eine 63-89% Wahrscheinlichkeit an falsch negativen Ergebnissen.

2.2.3 Die Therapie des Sommerekzems

Eine heilende Therapie des Sommerekzems ist bis heute nicht verfügbar. Symptomatische und therapeutische Maßnahmen werden dagegen zahlreich angeboten und führen zumindest zu einer Symptomverminderung. Angefangen von speziellem Aufstallungsmanagement und Futtermitteln, Sommerekzemer-Decken, Cremes, Insektizide bis hin zur Kortisol-Gabe gibt es kaum Ansätze, die betroffene Pferdebesitzern unversucht lassen. Als Goldstandard in der spezifischen Immuntherapie wird von der WHO die SCIT genannt, die auch für das Pferd erhältlich ist. Diese soll im Folgenden, neben den symptomatischen Therapeutika, dargestellt werden.

Symptomatische Therapie

Verschiedene Sommerekzemer-Decken werden als Mittel der Wahl bei der symptomatischen Behandlung von Sommerekzemern angesehen (BERGER et al. (2006)). Sie dienen in den Expositionsmonaten der Kontaktvermeidung mit der C. Mücke und damit mit der allergieauslösenden Substanz. Diese dünnen Decken verhüllen den Pferdekörper zu großen Teilen und partiell den Kopf des Pferdes (Abb.: 2.6). Ein kompletter Schutz kann allerdings nicht erreicht werden. So bleiben bei säugenden Stuten u.a. das hoch empfindliche Euter unbedeckt und auch der Hengst im Deckeinsatz kann nicht

ausreichend geschützt werden.



Abbildung 2.6 Sommerekzemer-Decke

Das Pferd trägt zum Schutz gegen die Mücken die 'Sommerekzemer-Decke'. Im ungeschützte Gesicht waren deutlich Kratzwunden zu sehen. Auch das unverhüllte Genitale war mit Exkorationen versehen.

Des weiteren werden zahlreiche Insektizide, Homöopathika, Cremes und weitere alternative Präparate angeboten, die zur lokalen Mückenabwehr oder zur Therapie der geschädigten Haut dienen sollen. Manche versprechen darüber hinaus eine Linderung des Juckreizes. Ein durchschlagender Erfolg wird dabei nicht berichtet. Ein interessanter Ansatz wird von O'NEILL et al. (2002) und SCHNEIDER (1999) vertreten. Sie gehen davon aus, dass die Ernährung Einfluss auf die Entwicklung und die Schwere der Symptome des Sommerekzems hat. Unterstützt wird diese These durch labordiagnostische Untersuchungen der importierten Islandpferde, die nicht nur unter den klimatischen Veränderungen leiden, sondern auch unter dem veränderten Futterangebot. Während in Island ein sehr

karges Angebot an nährstoffreichem Futter geboten wird, stoßen die Tiere in Deutschland auf satte Weiden. Dies führt unter anderem zu erhöhten Leberwerten und damit zu einer Schwächung des Immunsystems mit der möglichen Folge der Entwicklung von Allergien, wie dem Sommerekzem. In diesem Zusammenhang entwickelte STOLL (2004) eine sog. Ökozon-Therapie, die durch verschiedene Kräuterflüssigkeiten und -würfel die Stoffwechselvorgänge allergischer Tiere unterstützen soll. Im selben Zuge werden von dieser Firma diverse Shampoos und Lotionen vermarktet, die die betroffenen Hautpartien pflegen und auch der Insektenabwehr dienen sollen.

Aus tierärztlicher Sicht können Antihistaminika verabreicht werden, deren Wirkung jedoch umstritten ist. In extremen Fällen ist die Applikation von Langzeitkortikosteroiden indiziert, die aber in Hinblick auf zahlreiche Nebenwirkungen nicht als lebenslange Therapie eingesetzt werden sollten (KIETZMANN et al. (2002)).

Zusammenfassend scheint die Allergenvermeidung die erfolgreichste Strategie gegen die Symptome des Sommerekzems zu sein. Dies kann nicht zuletzt dadurch erreicht werden, einen geeigneten Standpunkt der Weide und des Stalles zu wählen. Da *Culicoides* Mücken in aller Regel gewässernah leben, gilt es diesen Bereich zu meiden. Ideal erscheinen zudem Hochlandweiden mit stetiger Luftbewegung, da dort nur selten *Culicoides* zu finden sind. Da eine solche Haltung nicht oft gewährleistet werden kann, bleiben nur die erwähnten Maßnahmen oder eine spezifische Immuntherapie.

Spezifische Immuntherapie

Eine spezifische Immuntherapie ist eine schrittweise Gewöhnung des Immunsystems an das Allergen. Dem Allergiker werden stetig steigende Konzentrationen des Allergens nach einem bestimmten Zeitschema verabreicht, mit dem Ziel allergische Symptome zu mindern (BOUSQUET et al. (1998), WAGNER (2005)). Bis heute ist der

Wirkungsmechanismus einer SCIT nicht vollständig geklärt (LÖWENSTEIN und MÜLLER (2008)). Theorien gehen davon aus, dass die SCIT zu einer Immundelevation führt, also zu einer Modulation der T-Helfer Antwort. Es werden demnach supprimierende antigenspezifische Th1-Zellen gebildet, die durch die Produktion von IFN γ , die IgE-Bildung und die Entwicklung von Th2-Zellen hemmen (SECRIST et al. (1993), EBNER et al. (1997)). Darüber hinaus wurde bei dieser Therapie eine Induktion von Treg Zellen von LANCHE et al. (2006) gezeigt. Diese Tregs können die Immunantwort der T-Effektor Zellen unterdrücken (LÖWENSTEIN und MÜLLER (2008)). Durch die SCIT wird auch die Produktion von regulatorisch wirkenden Zytokinen (IL-10 und TGF β) induziert, wie AKDIS et al. (1998), NASSER et al. (2001) und TARZI et al. (2006) erforschten. Außerdem zeigten AKDIS et al. (1996) eine Epitope spezifische Induktion von T-Zell Anergie. Therapeutische Erfolge der SCIT sind sowohl humanmedizinisch, als auch tiermedizinisch zu verzeichnen (LÖWENSTEIN und MÜLLER (2008)). Allerdings konnten verschiedene Forscher unterschiedliche Ergebnisse im Bezug auf das Ausmass der Symptomminderung erzielen. BARBET et al. (1990) veröffentlichten eine Studie, bei der es durch eine SCIT am Pferd nur zu einer geringgradigen Symptomverbesserung gekommen war. Im Gegensatz dazu zeigten ANDERSON et al. (1996) einen Erfolg der Therapie, der aber nach Beendigung der Behandlung bei einem Großteil der Patienten nicht mehr zu erkennen war. Damit wird postuliert, dass eine SCIT möglicherweise lebenslänglich durchgeführt werden muss.

Es existieren weitere immuntherapeutische Ansätze, wie z.B. präventive Impfungen der Pferde mit *Culicoides*-Extrakten, evtl. vor dem Export aus Island (3RD HAVEMEYER WORKSHOP et al. (2007)) oder Immuntherapien mit DZs, die aus dem Vollblut generiert und nach Beladung mit *Culicoides*-Extrakten dem Pferd injiziert werden (DIETZE (2009)).

Alle diese Therapieansätze haben gemeinsam, dass sie durch Injektion verabreicht werden. Dies kann zu lokalen inflammatorischen Reaktionen führen, wie es bereits bei der IDT (2.2.2) von LANGNER et al. (2008) und bei der Injektion des Adjuvants Alum durch KOOL

et al. (2009) gezeigt werden konnte. Solche Reaktionen können negativen Einfluss auf die Immuntherapie haben. Schlussfolgernd ist zu sagen, dass auch die SCIT zu keinem durchschlagenden Erfolg geführt, aber es deutliche Anzeichen einer klinischen positiven Wirkung durch die Applikation des Allergens gegeben hat. Dies bietet Anlass zur Entwicklung einer epikutanen Immuntherapie, die auf gut erforschte Strukturen der SCIT zurückgreift, ohne Inflammasreaktionen auszulösen.

2.3 Epikutane Toleranzinduktion

Gesunde, nicht allergische Individuen reagieren weder auf Selbst-Antigene, noch auf unschädliche Fremd-Antigene. Dies wird vor allem von zentralen und peripheren immunologischen Toleranzmechanismen kontrolliert. Kommt es zu einem Versagen der Toleranz gegen Selbst-Antigene, spricht man von Autoimmunität, bei Fremd-Antigenen von Allergie. Eine erfolgreiche Immuntherapie sollte demnach die Toleranzmechanismen erneut aufbauen und auf diese Weise die allergischen Symptome unterdrücken.

Mittlerweile existieren diverse Ansätze von Immuntherapien. Die bereits erwähnte SCIT (2.2.3) ist die bisher einzige kommerziell verfügbare, allergenspezifische Immuntherapie. Daneben wird an einer sublingualen, allergenspezifischen Immuntherapie geforscht, über deren Wirksamkeit kontrovers diskutiert wird (NELSON (2007), SIEBER et al. (2010), SCADDING et al. (2010)). An intralymphatischen Allergeninjektionen als therapeutische Maßnahme, experimentieren MARTINEZ-GOMEZ et al. (2008) und SENTI et al. (2009b). Ein weiterer neuartiger Ansatz ist die EPIT, deren Wirksamkeit auch in dieser Arbeit untersucht wurde.

2.3.1 Toleranzmechanismen

Immunologische Toleranz bezeichnet den Zustand des Immunsystems körpereigene Strukturen und harmlose Fremd-Antigene nicht zu bekämpfen. Man unterscheidet dabei die zentrale von einer peripheren Toleranz. Von zentraler Toleranz spricht man, bei der Vermeidung von Autoimmunreaktionen durch die Deletion autoreaktiver T-Zellen im Thymus (MAHNKE et al. (2002)) und B-Zellen im Knochenmark (SAKAGUCHI et al. (2008)). Den Thymus bzw. das Knochenmark verlassen nur T- und B-Zellen, die hoch-affin für Fremd-Antigene, niedrig-affin für Selbst-Antigene sind, und die sog. natürlichen Treg (nTreg) (LUTZ und KURTS (2009)). Werden trotz dieser Selektion autoreaktive B- und T-Zellen freigesetzt, werden diese in der Peripherie funktionell inaktiviert (Anergie) oder überleben durch die Induktion des aktivierten Zelltods (Deletion) nicht lange (SAKAGUCHI et al. (2008)). Neben diesen Mechanismen zählt man die Aktivierung, der aus dem Pool der naiven T-Zellen stammenden sog. induzierten regulatorischen T-Zellen (iTregs, $CD4^+$, $CD25^+$, $FoxP3^+$) und die Induktion der IL-10 produzierenden regulatorischen T-Zellen ($CD4^+$, $FoxP3^-$) zu der sog. peripheren Toleranz (SAKAGUCHI et al. (2008), O'GARRA et al. (2004)). Verschiedene Studien haben gezeigt, dass DZs eine entscheidende Rolle bei der Induktion der peripheren Toleranz, aber auch bei der Aktivierung von Entzündungsreaktionen spielen (YAMAZAKI et al. (2008), AKBARI et al. (2001), WAITHMAN et al. (2007)). DZs erkennen nahezu jedes Antigen durch die Expression von 'pattern recognition' Rezeptoren, wie die 'Toll-like', 'NOD-like' und 'C-type lectin' Rezeptoren (LAMBRECHT und HAMMAD (2009)). Die DZs liegen in aller Regel als unreife Zellen in den Geweben und der Haut vor (LAMBRECHT und HAMMAD (2008)). Kommt eine DZ in Kontakt mit einem Allergen oder einem schädlichen Fremd-Antigen, führt das zur Reifung der DZ und zur Aktivierung von T-Zellen, wie den Th1 oder Th2 Zellen (RANDOLPH (2001), HAMMAD et al. (2009), CLAUSEN und KEL (2010)). Wird ein Selbst-Antigen in

Form von apoptotischem Zellmaterial oder unschädlichem Fremd-Antigen ohne weiter Kostimulation erkannt, wandern semireife sog. 'steady state' migratorische DZs zum nächsten Lymphknoten und aktivieren dort tolerogene Mechanismen (AKBARI et al. (2001), LUTZ und SCHULER (2002)), wie z. B. die klonale T-Zell Anergie (SCHWARTZ et al. (1989)) oder die Induktion von Tregs und Tr1-Zellen (LARCHE et al. (2006), UMETSU et al. (2002)). Im Bezug auf die Toleranzinduktion durch DZs zeigten YAMAZAKI et al. (2008), dass CD8⁺ Milz DZs naive CD4⁺ Zellen zu iTregs konvertieren können. Dabei spielten die Anwesenheit von TGF β und der exprimierte PD-L1 auf DZs eine entscheidende Rolle (LUTZ und KURTS (2009)). Blickt man separat auf die Wirkungsweise der Tr1-Zellen und Tregs, ist eine Studie von AKDIS et al. (2008) zu erwähnen. Sie untersuchten allergische und gesunde Personen und konnten zeigen, dass bei allen drei verschiedene, allergenspezifische T-Zell Subtypen ausgebildet waren: die Th1, Th2 und Tr1 Zellen. Der Unterschied zwischen krank und gesund lag in dem vorliegenden Verhältnis der Zellarten. Waren Th2 Zellen dominant, lag eine Allergie vor, waren es die Tr1 Zellen war die Person gesund. Auch MEILER et al. (2008) konnten die entscheidende Rolle von Tr1 Zellen bei einer Untersuchung von nicht-allergischen Imkern nachweisen. Die Imker zeigten jedes Jahr zu Beginn der Bienensaison allergische Symptome auf Bienenstiche. Nach einer Vielzahl von Bienenstichen konnten im Blut allergenspezifische, klonierte Th1 und Th2 Zellen detektiert werden, die sich zu Tr1 Zellen wandelten. Gleichzeitig konnte klinisch eine Reduktion der allergischen Symptome auf die Bienenstiche und eine Suppression der allergenspezifischen Th1 und Th2 Zellen erkannt werden. Im Bezug auf die Induktion von Toleranz, brachte die Forschung von APOSTOLOU und VON BÖHMER (2008) weitere Erkenntnisse. Sie zeigten, dass durch die nicht invasive Applikation von Antigenen durch die Haut Tregs induziert werden können. Wird das harmlose Antigen über den Atmungstrakt verabreicht, konnten AKBARI et al. (2001) beweisen, dass die DZ Zellen der Lunge IL-10 produzieren und weitere Tr1 Zellen zur Freisetzung von IL-10 stimulieren.

Durch diese Experimente werden die entscheidenden Positionen von Tregs und Tr1-Zellen bei der Toleranz-Induktion gegen Allergien deutlich. Wie in der Abbildung 2.7 zu sehen, können Tregs und Tr1-Zellen auf verschiedene Immunzellen und auf Gewebe regulierend einwirken. Dies geschieht zum einen durch die Synthetisierung und Freisetzung von IL-10 und TGF- β . Dadurch kommt es zur Suppression von Th1, Th2 und Th17 Zellen, von inflammatorischen DZ und von basophilen und eosinophilen Granulozyten (AKDIS und AKDIS (2009a)). Des Weiteren wird die Produktion von IgE der Plasmazellen unterdrückt und die von IgG4 und/oder IgA (Mensch) induziert (M.HAWRYLOWICZ und A.O'GARRA (2005), AKDIS und AKDIS (2009a)). Darüber hinaus sind supprimierend wirkende Oberflächenmoleküle der Tregs bekannt, wie CTLA-4 (Antigen zytotoxischer T-Lymphozyten), PD-1 (programmierter Zelltod) und dem Histamin Rezeptor 2 (HR2) (VIGNALI et al. (2008), AKDIS (2009)). Die Zell-Zell Interaktionen der Tregs mit Mastzellen durch OX40 und dem Liganden OX40L führt ebenfalls zu einer direkten Suppression der Mastzellen. Hinzu kommen die indirekten Einflüsse der Tregs durch die Hemmung von Th2 Zellen und der damit aussetzenden Produktion der Zytokine IL-3, IL-4, IL-5, IL-9 und IL-13, wie AKDIS (2009) zusammenfasste. Diese Zytokine dienen u.a. der Differenzierung, dem Fortbestehen und der Aktivität von Mastzellen, Basophilen, Eosinophilen und den schleimbildenden Zellen. Sie spielen auch eine Rolle beim sog. 'Homing' der Th2 Zellen ins Gewebe. Somit haben Tregs einen indirekten Einfluss auf die allergische Reaktion im Gewebe (AKDIS (2009)). Tregs inhibieren aber nicht nur. Neben der Aktivierung von Plasmazellen zur Produktion von IgG4 und/oder IgGA können sie auch DZs zur Synthese von IL-10 anregen (AKBARI et al. (2001), AKDIS und AKDIS (2009a)).

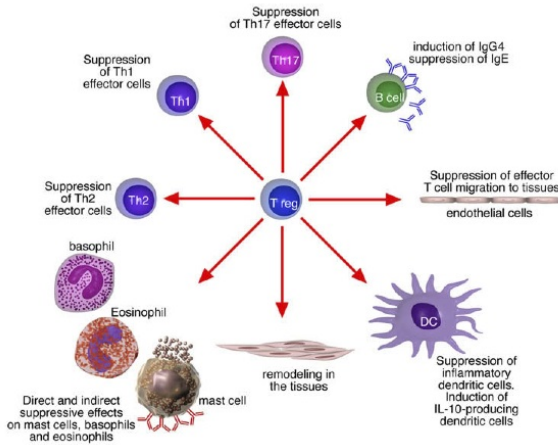


Abbildung 2.7 Toleranz Induktion durch regulatorische T-Zellen

Tregs spielen eine entscheidende Rolle bei der Induktion von Toleranz gegen Fremd-Antigene. Dabei sind sowohl intrazelluläre Kontakte entscheidend, wie auch die Auswirkung der synthetisierten Zytokine, wie IL-10 und TGF- β . Veröffentlichung dieser Grafik nach freundlicher Genehmigung von C. A. Akdis und dem Verlag Elsevier aus der Publikation: AKDIS und AKDIS (2009a)

Kommt es bei einem Kontakt mit einem harmlosen Antigen zu einer allergischen Reaktion haben u.a die Toleranzmechanismen versagt. Um diese wieder herzustellen, erscheint das Präsentieren des Allergens auf der intakten Haut zur Phagozytose durch 'steady-state' migratorische DZs als ein möglicher therapeutischer Ansatz. Entscheidend ist, dass keine inflammatorischen Signale (z.B. durch Injektion) ausgelöst werden und somit keine Reifung der DZs statt findet. Gelingt es ausreichend migratorische DZs beladen mit dem Allergen zur Migration zu veranlassen und anschließend Tregs oder Tr1 Zellen zu aktivieren, kann es zu einer Wiederherstellung der Toleranz gegen das Allergen kommen.

2.3.2 Die Haut als Immunorgan

Ein Zitat von SIMON (1994) zeigt die Bedeutung der Haut als Immunorgan: 'Nach heutigem Verständnis ist die Haut nicht nur passive Hülle unseres Organismus, sondern ein aktives Organ im Verbund des peripheren Immunsystems. Eine enge Assoziation von Haut und Immunsystem erscheint sinnvoll, denn die Haut steht wie kaum ein anderes Organ im steten Wechselspiel mit der Außenwelt'. Bereits im Jahr 1983 war bekannt, dass sowohl Keratinozyten, als auch die nach dem deutschen Arzt Paul Langerhans (1868) bezeichneten Langerhans-Zellen eine entscheidende Rolle im Immunsystem der Haut spielen. Mittlerweile werden Langerhans-Zellen zu der Familie der DZs gezählt (SCHULER und STEINMAN (1985)). Diese dermalen DZs, gemeinsam mit den Keratinozyten, den epidermotropen T-Lymphozyten und den peripheren Lymphknoten bilden das sog. kutane Immunsystem, auch als SALT (=Skin associated-lymphoid tissue) bezeichnet (STREILEIN (1983)). Histologisch besteht die Epidermis zu 85% aus Keratinozyten, 3-8% residenten DZs, ca. 5% Melanozyten und ca. 2% Merkel-Zellen. Zudem befinden sich in der Haut T-Zellen mit einem gamma delta Rezeptor, sog. dendritische epidermale T-Zellen (DETC) (WHANG et al. (2009)). Sie dienen der Aktivierung und Inhibition von Immunantworten und spielen eine Rolle bei der Hautregeneration (JAMESON et al. (2004)).

Die Keratinozyten bilden die Hornzellschicht, die dem Organismus als Schutz vor Flüssigkeitsverlust und dem Eindringen von externen Noxen dient. Die Langerhans-Zellen und die dermalen DZs, die ihre Dendriten zwischen die Keratinozyten schieben und so ein dichtes Netzwerk über den gesamten Körper bilden (SCHULER et al. (1982)), zeichnen sich unter anderem durch ihre Migrationsfähigkeit aus (BANCHEREAU und STEINMAN (1998)). Sie können Eigen- und Fremd-Antigene phagozytieren, diese im nächstgelegenen Lymphknoten präsentieren und dort naive T-Zellen aktivieren. Ist das dargebotene Antigen verbunden mit einer Infektion, führt es zur Aktivierung von Th1 oder Th2 Zellen. Ist das Antigen ein harmloses

Fremd-Antigen oder ein Selbst-Antigen wird die Toleranz-Induktion ausgelöst. Damit dienen DZs der 'Kommunikation' zwischen der Haut und dem übrigen körpereigenen Immunsystem (LUTZ et al. (2010)). In diesem Zusammenhang zeigten APOSTOLOU und VON BÖHMER (2008), dass durch die nicht invasive Applikation von geringen Mengen Antigen durch die Haut Tregs aktiviert werden können. Sie arbeiteten mit einer mikroosmotischen Pumpe, die Mäusen unter die Haut gesetzt wurde und dort stetig, gleichbleibende Mengen Antigen an die Haut-Zellen abgab. In der Arbeitsgruppe wurde vermutet, dass die Induktion der Tregs auf DZs zurückzuführen war, die in Ermangelung entzündlicher Signale keinen komplett reifen Zustand erreichten.

Kontroverse Ansichten gibt es über die Verteilung der dermalen DZs in der Haut. HAMADA et al. (1992) beschreiben, dass es beim Pferd in der normalen Epidermis eine gleichmäßige Verteilung von 2-10 Langerhans-Zellen pro 200 Keratinozyten gibt. Dagegen weist GOLDSMITH (1991) daraufhin, dass die Anzahl der Haut-DZs innerhalb eines Individuums von Hautregion zu Hautregion unterschiedlich ist. WHITE und YAGER (1995) gehen von einer schwankenden Anzahl beim Vergleich zwischen den Spezies aus. Sicher ist, dass Langerhans-Zellen vor allem in der Epidermis zu finden sind, während dermale DZs in der darunter gelegenen Dermis lokalisiert werden (WAITHMAN et al. (2007)).

2.3.3 Penetrationsfähigkeit der Haut

In der Promotionsarbeit von RIEDEL (2003) wurde die perkutane Penetration durch die Haut untersucht. Sie stellte folgende Punkte heraus:

1. Die Permeabilisationsrate steigt mit der Löslichkeit der Substanz (STÜTTGEN und SCHÄFER (1974)).

2. Hydrophile Stoffe diffundieren nur begrenzt durch die Hornschicht, im Gegensatz zu ungeladenen lipophilen Substanzen (SCHÄFER et al. (1982)).
3. Die Polarität der Substanz hat keinen Einfluss auf die Penetrationsfähigkeit (KOCH (1985)).
4. Die Molekülgröße (außer bei hochmolekularen Substanzen) spielt nur eine untergeordnete Rolle (STÜTTGEN und SCHÄFER (1974)).
5. Die Penetration steigt durch Erhöhung der Hydratation der Hornschicht (z.B. durch Okklusion) (WOHLRAB (2001)).

MARZULLI (1962) zeigte darüber hinaus, dass sich die Permeabilisationsfähigkeit bei einzelnen Tierarten unterscheidet. Während bei der Maus die Barrierefunktion sehr schwach ist, ist sie beim Schimpansen, ähnlich dem Menschen, sehr stark ausgebildet. Die Pferdehaut liegt zwischen den beiden Extremen. Dies lässt sich vor allem auf die Unterschiede in der Anzahl der Haare und Drüsen und auf die abweichende Dicke des Stratum corneum zurückführen. Damit kann auch erklärt werden, dass es einen Zusammenhang zwischen der Resorptionsrate und der Körperregion gibt (FELDMANN und MAIBACH (1967)). Außerdem hat das Hautalter einen Einfluss auf die perkutane Penetration, wie POULSEN (1972) feststellte. Juvenile Haut ist auf Grund des höheren Wassergehaltes und des verringerten Lipidgehaltes permeabler, als die adulte Haut. Im Bezug auf die Hautdicke gibt es zudem innerartliche Unterschiede. MEYER (1997) zeigte, dass die Haut bei vollblütigen Pferden im allgemeinen dünner ist, als bei schweren Zugpferden. Die Hautdicke schwankt je nach der Körperregion zwischen 1,7 und 6,3mm mit einem Durchschnittswert von 3,8mm. Sie nimmt dabei von kranial nach kaudal zu und vom Rücken zum Abdomen und an den Gliedmaßen von proximal nach distal ab. Die größte Dicke ist in der Lenden-, Kruppen- und Schwanzregion zu messen (SCOTT und MILLER (2003)).

2.3.4 Toleranzinduktion durch die epikutane, allergenspezifische Immuntherapie

Vor mehr als 50 Jahren zeigten BLAMOUTIER et al. (1959) die klinische Wirksamkeit einer epikutanen Allergen-Applikation. Sie rauten dabei die Innenseite des Unterarmes seiner Heuschnupfen-Patienten mit einer Nadel auf und verabreichten auf diesen Bereich das Immuntherapeutikum. Es soll zu einer Besserung oder auch Heilung von Heuschnupfen gekommen sein. Darauf aufbauend veröffentlichten SENTI et al. (2009a) eine klinische Phase I und II Studie einer EPIT bei Graspollen-Allergikern. Bei diesem Ansatz wurde die Haut der Patienten am Oberarm durch mehrmaliges Abziehen eines Klebestreifens vorbehandelt. Anschließend wurde das Therapeutikum in Form eines Pflasters appliziert. Es konnte ebenfalls ein positiver Effekt der Therapie dargestellt werden, allerdings zeigten die Patienten mit dem Wirkstoffpflaster deutliche Ekzembildung an dem behandelten Hautbereich, im Gegensatz zu der Placebo-behandelten Gruppe. Dies kann als ein Zeichen der Aktivierung und Reifung von DZs gewertet werden, was bei einer Immuntherapie mit Toleranzerzeugung kontraproduktiv sein kann. STRID et al. (2004) und STRID et al. (2006) zeigten in diesem Zusammenhang, dass eine Zerstörung des Stratum corneums zu einer Induktion von Th2-Zellen führt und damit der gegenteilige Effekt der Therapie erreicht wird. Das es trotzdem einen Therapieerfolg gab, könnte mit der Entdeckung von EYERICH et al. (2008) erklärt werden. Sie belegten, dass es bei einer Allergen-Applikation auf die Haut allergischer Menschen zu einer initialen Th2-Antwort kommt. Wird der Körper über längere Zeit dem Allergen ausgesetzt, kann ein Shift der Immunantwort von Th2 zu Th1 beobachtet werden. Anstelle der Interleukine IL-4 und IL-5 (Th2) wird predominant IFN γ (Th1) produziert. Somit wäre der Wirkmechanismus der EPIT vergleichbar mit dem der SCIT. Einen therapeutischen Erfolg einer nicht invasiven EPIT veröffentlichten MONDOULET et al. (2009). Sie führten eine Immuntherapie am Maus-Asthma-Modell durch und

konnten zeigen, dass es bei der Therapiegruppe zu einer Verbesserung der allergischen Symptome gekommen war. Entscheidend bei dieser Art der EPIT war, dass Okklusion erzeugt wurde und damit das Allergen gut durch die Haut diffundieren konnte. Eine Zerstörung des Stratum corneums zur Allergen-Präsentation für die 'steady-state'-migratorische DZs ist damit unnötig.

3 Material und Methoden

3.1 Tiere

3.1.1 Mäuse

Die Versuchstiere stammen sowohl von Charles River International (Kisslegg, Sulzfeld, D), von Harlan-Winkelmann Laboratories (Borchen, D), als auch zu kleinen Teilen aus der hauseigenen Mauszucht. Es waren stets weibliche Balb/c-Mäuse, zu Versuchsbeginn im Alter von 8-10 Wochen. Der Versuch wurde frühestens drei Tage nach Umsetzung der Tiere in neue Käfige begonnen. Die Haltung war stets in Gruppen von 2-8 Mäusen in offenen Käfigen der Größe Typ 3n oder 2. Die Mausversuche wurden in dem Tierversuchsantrag 55.2-2531.01-73/07 von der Regierung Unterfranken genehmigt.

3.1.2 Pferde

Zur Etablierung und Durchführung der Allergiediagnostik wurde von insgesamt 51 Pferden Blut genommen. Von 27 Pferden wurde sowohl im Sommer 2008, als auch im Sommer 2009 ca. 20ml Blut gewonnen. Davon waren 9 Pferde ohne klinische Symptome und 18 Pferde, den Symptomen nach als Sommerexzemer eingestuft.

Im Sommer 2009 wurde von weiteren 24 vermutlichen *Culicoides*-Allergikern Blut zur Diagnostik genommen. Insgesamt waren die Tiere im Durchschnitt 14,9 Jahre alt (3-28 Jahre). Die gesunden Pferde waren durchschnittlich 15,3 Jahre alt (8-20 Jahre), die *Culicoides*-Allergischen 14,8 Jahre (3-28) und die Nicht-*Culicoides*-Allergischen 14,4 Jahre (7-21). Es waren 19 Stuten, 28 Wallache und 4 Hengste Teil der Studie. In der 'gesunden' Gruppe waren nur Wallache (9), in der *Culicoides*-Allergischen Gruppe 14 Stuten, 16 Wallache und 3 Hengste und in der Nicht-*Culicoides*-Allergischen Gruppe 5 Stuten, 3 Wallache und 1 Hengst.

Die Pferderassen-Verteilung ist in Tabelle 3.1 zu sehen, ebenso die Verteilung der Rassen auf die jeweilige Diagnose. Die größte Anzahl an getesteten Pferden machen die Islandpferde aus. Dies liegt nicht nur an der Rassendisposition, sondern auch daran, dass im Sommer 2008 gezielt die drei größten Islandpferde-Höfe im Raum Unterfranken aufgesucht wurden. Von diesen Höfen stammen zudem die 9 gesunden Pferde, ebenfalls Isländer. Vor der Blutentnahme wurde von jedem Besitzer das Einverständnis zur Blutentnahme eingeholt. Alle Pferde wurden regelmäßig geimpft und entwurmt.

Die Pferdeversuche wurden in der Tierversuchsanzeige 55.2 - 2531.01 - 78/09 von der Regierung Unterfranken genehmigt.

3.2 Material

Unter Kapitel 3.9 dieser Arbeit sind alle verwendeten Geräte, Reagenzien, Verbrauchsmaterialien, Analyse-Kits und Arzneimittel aufgelistet. Selbst angesetzte Lösungen, Medien und Puffer werden im folgenden Abschnitt detailliert beschrieben. Zum Lösen der Puffer und zum Ansetzen der Lösungen wurde entweder das im Haus der Immunbiologie Würzburg hergestellte sterile PBS (frei von Ca^{2+} , Mg^{2+}) oder steriles, destilliertes Wasser aus der Deionisationsanlage verwendet.

Tabelle 3.1 Pferderassenverteilung

Pferderasse	Gesamt-Anzahl	Nicht Allergiker	C.-Allergiker	Nicht-C.- Allergiker
Island-Pferde	30	9	18	3
Misch-Rassen	5	0	2	3
Shetlandpony	5	0	3	2
Friese	3	0	3	0
Andalusier	1	0	1	0
Paint	1	0	1	0
Criollo	1	0	1	0
Polnisches Warmblut	1	0	1	0
Bayerisches Warmblut	2	0	2	0
Haflinger	1	0	1	0
Irish Tinka	1	0	0	1

3.2.1 Zellkulturmedium R10

Tabelle 3.2 Zellkulturmedium R10

Menge	Reagenz
500ml	RPMI 1640 (Bio-Whittaker Cambrex, New Jersey)
50ml	hitzeinaktiviertes, steril filtriertes fötales Kälberserum (PAA, Pasching)
5,6ml	L-Glutamin, 200mM (Sigma, Deisenhofen)
5,6ml	Penicillin (10 000Units/ml) / Streptomycin (10mg/ml) (Sigma, Deisenhofen)
50µl	β-Mercaptoethanol (Sigma, Deisenhofen)

Das Zellkulturmedium wurde nach dem Ansetzten bei 4°C gelagert. Vor Verwendung wurde es, bis zum Erreichen der Raumtemperatur, unter die Sterilbank gestellt.

3.2.2 Paraformaldehyd 4%

Das Paraformaldehyd 4% wurde zum Einlegen und Aufbewahren der Mauselungen benötigt und nach dem folgenden Rezept zusammengesetzt:

Tabelle 3.3 Paraformaldehyd 4%

Menge	Reagenz
20g	Paraformaldehyd (Sigma, Deisenhofen)
500ml	PBS (frei von Ca^{2+} , Mg^{2+} , Immunbiologie Würzburg)
	10M $NaOH$

450ml PBS und 20g Paraformaldehyd wurden in einem Becherglas unter dem Abzug zusammengefügt. Im Anschluss daran wurden die Substanzen unter Rühren bei 70°C gekocht, bis alle gelöst vorlagen. Zudem wurde die Lösung mit 10M $NaOH$ tropfenweise klar titriert. Nach dem Abkühlen wurde das Paraformaldehyd mit PBS auf 500ml aufgefüllt und bis zum Verwenden entweder bei -20°C auf Vorrat eingefroren oder bei 4°C für den schnellen Verbrauch gelagert.

3.2.3 Ammoniumchlorid-Lösung 1,6%

Die Ammoniumchlorid-Lösung (NH_4Cl) wurde als 1,6% Stocklösung für die Lyse der Erythrozyten bei der Aufreinigung der Milzzellen benötigt. Sie wurde, wie in Tabelle 3.4 zu sehen, zusammengesetzt, steril filtriert und bei Raumtemperatur bis zur Verwendung gelagert.

Tabelle 3.4 Ammoniumchlorid-Lösung 1,6%

Menge	Reagenz
16ml	10% Ammoniumchlorid-Lösung (NH_4Cl_2 , AppliChem Biochemica, Darmstadt)
84ml	PBS (frei von Ca^{2+} , Mg^{2+} , Immunbiologie Würzburg)

3.2.4 Narkose Maus

Das Anästhetikum wurde pro Maus wie folgt zusammengesetzt:

Tabelle 3.5 Narkose Maus

Menge	Reagenz
14,4 μ l	Ketamin, Ketavet® 10%, Medistar, Apotheke
9,0 μ l	Xylazin, Rompun® 2%, BayerHealthCare, Apotheke
76,6 μ l	PBS (frei von Ca^{2+} , Mg^{2+} , Immunbiologie Würzburg)

Pro Maus wurden 100 μ l i.p. (intra peritoneal) injiziert. Nach ca. 5 Minuten wirkt die Narkose und der Zwischenzehenreflex ist deutlich reduziert. Da auch der Lidreflex unterdrückt ist, wird ein Tropfen Liquifilm® (Allergan, Apotheke) zum Schutz der Augen vor Austrocknung, auf die Pupille getropft.

3.2.5 Letale Narkose Maus

Zum Euthanasieren der Mäuse wurden 200 μ l einer Überdosis Anästhetikum nach dem folgenden Rezept i.p. injiziert:

3. Material und Methoden

Tabelle 3.6 Letale Narkose Maus

Menge	Reagenz
93 μ l	Ketamin, Ketavet [®] 10%, Medistar, Apotheke
58 μ l	Xylazin, Rompun [®] 2%, BayerHealthCare, Apotheke
49,0 μ l	PBS (frei von Ca^{2+} , Mg^{2+} , Immunbiologie Würzburg)

3.2.6 Pipes A

Der Puffer Pipes A wurde nach dem Protokoll von KOBELT (2001) zehnfach konzentriert hergestellt. Das Pipes A wurde bei -20°C eingefroren und vor dem Gebrauch mit sterilen, destillierten Wasser 1:10 verdünnt.

Tabelle 3.7 Pipes A

Menge	Reagenz
0,643g (110mmol)	$NaCl$ (AppliChem GmbH, Darmstadt)
0,037g (5mmol)	KCl (Merck, Darmstadt)
0,756g (25mmol)	Pipes $C_8H_{18}N_2O_6S_2$ (AppliChem GmbH, Darmstadt)
0,16g (40mmol)	$NaOH$ (Carl Roth GmbH+Co, Karlsruhe)
10ml	steriles, destilliertes Wasser

3.2.7 Pipes B

Für die Freisetzung von Histamin wurde $CaCl_2$ und $MgCl_2$ in dem Puffer Pipes A benötigt. Nach dem Auftauen und 1:10 verdünnen von Pipes A mit sterilem, destillierten Wasser, wurden $CaCl_2 + 2H_2O$ und $MgCl_2 + 6H_2O$ zugegeben, der pH auf 7,4 eingestellt und die Lösung steril filtriert. Der Puffer wurde bei 4°C gelagert.

Tabelle 3.8 Pipes B

Menge	Reagenz
3ml	Pipes A (10-fach konzentriert)
1,47g (2mmol)	$CaCl_2 + 2H_2O$ (Ferak, Berlin)
2,03g (2mmol)	$MgCl_2 + 6H_2O$ (Ferak, Berlin)
27ml	steriles, destilliertes Wasser
	Reagenzien zum Kalibrieren (u.a. $NaOH$, HCl)

3.2.8 PBS mit 2% EDTA

Die Lösung wurde für das Waschen der Blutzellen bei der Zellseparation zur Vermeidung von Verklumpungen benötigt. Sie wurde bei Raumtemperatur angesetzt und so lange gerührt bzw. geschüttelt bis das EDTA gelöst vorlag. Vor dem Verwenden wurde die Lösung steril filtriert und bei Raumtemperatur gelagert.

Tabelle 3.9 PBS mit 2% EDTA

Menge	Reagenz
2g	EDTA (Sigma, Deisenhofen)
100ml	PBS (frei von Ca^{2+} , Mg^{2+} , Immunbiologie Würzburg)

3.2.9 *Culicoides nubeculosus*, Lyophilisat (Greer Labs)

Das Lyophilisat wurde zum einen für die Restimulation der Blutzellen benötigt, um den Allergietest durchzuführen und zum anderen für das Herstellen des Therapeutikums. Das Pipes B (3.2.7) wurde zur Lösung des Lyophilisats mit einer Spritze durch den Gummiverschluss in die Ampulle mit dem Mückenextrakt gespritzt,

damit beim Öffnen des Gefäßes kein Lyophilisat verloren ging. Anschließend wurde die Ampulle geöffnet und die Lösung über einer Sephadex PD10 Säule nach Verpackungsanleitung vom Histamin gereinigt. Der Proteingehalt wurde am Spektralphotometer 'Nanodrop' gemessen. Die Lösung wurde entsprechend der gewünschten Konzentration aliquotiert und bei -20°C eingefroren.

Tabelle 3.10 *Culicoides nubeculosus*, Lyophilisat

Menge	Reagenz
1 Ampulle 1ml	<i>Culicoides nubeculosus</i> Lyophilisat Pipes B (3.2.7)

3.2.10 Allergencreme - Therapie

Zur Herstellung der Salbengrundlage der Allergencreme wurde DAC Basiscreme (Apotheke) mit weißer Vaseline (Lichtenstein DAB, Apotheke) in einem Mörser (Apotheke) mit einer Pistill (Apotheke) vermengt. Zur Therapie der Mäuse wurde das Protokoll von BYNOE et al. (2003) herangezogen und Ovalbumin-Peptid (OVA-peptid (327-339), Friedrich-Alexander Universität Erlangen-Nürnberg, Arbeitsgruppe Becker) in die Creme-Mischung pipettiert und anschließend mindestens 5 Minuten verrührt.

Zur Therapie der Pferde wurde statt dem OVA-Peptid die *Culicoides*-Pipes B Lösung (3.2.9) in gewünschter Konzentration eingerührt (siehe 4.5). Zu beachten war, dass die gewünschte Konzentration des OVA-Peptids auf 0,005g Creme für die Maus und auf 1g Creme für das Pferd eingestellt werden musste.

Die fertig angerührte Allergencreme für die Maus wurde komplett in eine Petrischale (0,9cm Durchmesser, Sarstedt, Nümbrecht) überführt und bei 4°C gelagert. Vor Verwendung wurden die Pflaster (*Fixomull*® transparent, BSN medical, Hamburg) auf die Breite von

1,5cm zugeschnitten und 0,005g Creme per Analysewaage (Typ SBA 32, Denver Instrument, Göttingen) direkt auf das Pflaster eingewogen. Für die Pferde-Therapie wurde 1g Allergencreme direkt in eine Petrischale eingewogen (Laborwaage (KB 1200-2), Kern, Ballingen) und bis zur Verwendung bei 4°C gelagert. Die Pflaster wurden auf eine Länge von ca. 30cm zugeschnitten und separat zu den Pferden mitgenommen.

3.2.11 Allergencreme - Placebo

Bei der Herstellung der Placebo-Kontrollcreme wurde stets die gleiche Menge an Salben-Grundlage verwendet, wie unter 3.2.10 beschrieben. Die Substanzen wurden in einem Mörser mit einer Pistill verrührt. PBS (frei von Ca^{2+} , Mg^{2+}) (Maus-Therapie) oder Pipes B (Pferde-Therapie) (3.2.7) wurde in der äquivalenten Menge der Allergene (3.2.10) untergemengt und erneut vermischt. Das weitere Vorgehen entspricht dem aus Kapitel 3.2.10.

3.3 Methode OVA-Asthma-Modell Maus

3.3.1 Induktion von OVA-allergischem Asthma bei der Maus

Für die Induktion einer Allergie bei Mäusen gegen das Protein Ovalbumin (OVA Protein, Sigma, Deisenhofen) wurde folgendes Protokoll nach WOHLLEBEN et al. (2004) verwendet:

3. Material und Methoden

Tabelle 3.11 Induktion OVA-Asthma-Modell

Tag	Injektions-Lösung	Injektions- menge	Injektions- art
Tag 0	150 μ l Alum (Serva), 50 μ l PBS, 10 μ g OVA Protein	200 μ l	i.p.
Tag 14	150 μ l Alum (Serva), 50 μ l PBS, 10 μ g OVA Protein	200 μ l	i.p.
Tag 22	50 μ l PBS, 100 μ g OVA Protein	50 μ l	i.n.
Tag 23	50 μ l PBS, 100 μ g OVA Protein	50 μ l	i.n.
Tag 24	50 μ l PBS, 100 μ g OVA Protein	50 μ l	i.n.
Tag 30	Analyse		

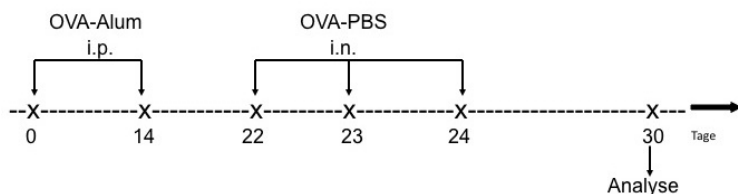


Abbildung 3.1 OVA-Asthma-Protokoll

Die i.n. (intra nasale) Injektion wurde stets unter Narkose (3.2.4) durchgeführt. Die Mäuse wurden nach dem Einsetzen der narkotischen Wirkung auf den Rücken gedreht. Anschließend wurde mit Hilfe einer Pipette (Brand, Wertheim) 50 μ l PBS/OVA Protein in ein Nasenloch pipettiert. Nach kurzem Warten wurden die Mäuse zurück auf den Bauch gedreht, bekamen einen Tropfen Liquifilm[®] (Allergan, Apotheke) zum Schutz der Augen. Die Tiere wurden auf Zellstoffpapier zurück in den Käfig gelegt, damit kein Einstreu in die noch offenen Augen gelangen konnte. Nach durchschnittlich 5-10 Minuten erwachten die Mäuse aus der Narkose.

Für die Negativkontrolle des Asthma-Modells wurde den entsprechenden Mäusen statt dem OVA Protein die äquivalente Menge PBS verabreicht.

3.3.2 Analyse OVA-Asthma-Modell Maus

Die Mäuse wurden durch eine letale Dosis Anästhetikum euthanasiert (3.2.5). Nachdem kein Herzschlag mehr festzustellen und der Zwischenzehenreflex erloschen war, wurde mit der Präparation begonnen.

Serum-Gewinnung

Zum Beginn der Präparation wurden die Mäuse zur Desinfektion mit Alkohol eingesprüht. Anschließend wurde die Vena axillaris frei präpariert und eröffnet. Das Blut wurde in einem 1,5ml Reaktionsgefäß (Eppendorf tube, Sarstedt, Nümbrecht) aufgefangen und 2 Stunden bei Raumtemperatur stehen gelassen. Nach dem vollständigen Koagulieren des Blutes wurde dieses 5 Minuten lang bei Raumtemperatur und 3000rpm (770g) zentrifugiert (Zentrifuge Typ Fresco 21, Heraeus, Hanau). Das Serum wurde mit einer weitmündigen Pipette abgenommen und in ein steriles Eppendorf tube überführt. Bis zur weiteren Analyse der Zytokine im ELISA wurde die Probe bei -20°C eingefroren.

Gewinnung der BAL

Durch die Spülung der Lungen erhält man Untersuchungsmaterialien aus den Bronchiolen und den terminalen Alveolen.

3. Material und Methoden

Zur Durchführung wird folgendes pro Tier benötigt:

Tabelle 3.12 Utensilien zur Entnahme der BAL

Menge	Material
1	Venenverweilkatheter, 20G, 1,1 x 32mm (Becton-Dickinson, Franklin Lakes)
1	sterile 1ml Spritze (Luer solo, Braun, Tuttlingen)
1	mit 1ml aufgezogenem PBS (phosphatgepufferte Kochsalzlösung)
1	1,5ml Reaktionsgefäß (Sarstedt, Nümbrecht) gefüllt mit 100 μ l inaktiviertes, steril filtriertes fötales Kälberserum (FCS)

Nach möglichst vollständigem Entbluten der Mäuse, erfolgte das Eröffnen des ventralen Halsbereiches mit vorsichtiger Freilegung der Trachea. Mit Hilfe eines Venenverweilkatheters sticht man in den kranialen Abschnitt der Trachea und führt, nach Entfernen des Mandrins, die Kanüle weitere 0,5 - 1cm in Richtung Lunge. Das in einer sterilen 1ml Spritze aufgezogene PBS wurde auf den Venenverweilkatheter aufgesetzt und der Inhalt langsam in die Lunge injiziert. Das PBS wurde anschließend aspiriert. Diese Lungenwaschung wurde zweifach wiederholt, ohne die Spritze abzusetzen. Nach der dritten Aspiration wurde die gewonnene Lavage in das mit FCS vorbereitete 1,5ml Reaktionsgefäß überführt. 100 μ l der BAL wurden zum Anfertigen von Zytospins benötigt (3.3.3). Nach Zellzählung wurde die Lavage 5 Minuten bei 4°C und 1200rpm (375g) zentrifugiert (Zentrifuge Typ Fresco 21, Heraeus, Hanau), der Überstand in ein neues 1,5ml Reaktionsgefäß überführt und bis zur weiteren Analyse der Zytokine bei -20°C eingefroren.

Organ-Entnahme

Zum Analysieren weiterer immunologischer Vorgänge wurden die Milz und die drainierenden Lungen-Lymphknoten entnommen und

in R10 Medium (3.2.1) auf Eis gelegt. Mit diesen Organen wurde, wie unter 3.3.4 beschrieben, verfahren. Des weiteren wurde die Lunge freipräpariert und in 4% Paraformaldehyd (3.2.2) bis zum weiteren Bearbeiten eingelegt.

3.3.3 Zytozentrifugation der BAL

Mit Hilfe der Zytozentrifugation ist es möglich, die Zellen der BAL (3.3.2) zu differenzieren und zu beurteilen. Für die Zytozentrifugation wurden die Einfachspannplatte mit Ring (Hettich, Tuttlingen), die Zytowinkelkammern (Durchmesser 6,2mm, Hettich, Tuttlingen), die Objektträger (Typ Superfrost, Hecht-Assistent, Sondheim) und die Filterkarten für die Zytowinkelkammer (Hettich, Tuttlingen) nach Herstellerbeschreibung zusammengebaut und 100 μ l der gewonnenen BAL in die Öffnung der Kammer mit einer 100 μ l Pipette (Brand, Wertheim) pipettiert. Mit der Zentrifuge (Universal 320, Hettich, Tuttlingen) wurden die Proben 5 Minuten, bei Raumtemperatur und 600rpm (100g) zentrifugiert. Anschließend wurden die Objektträger aus der Winkelkammer genommen und zum Trocknen ausgelegt. Nach vollständiger Trocknung wurden die Präparate nach Herstelleranleitung mit Diff Quick[®] - Färbelösung (Medion Diagnostics, Düringen) gefärbt, erneut getrocknet und mit Hilfe von Fluoromount (Serva, Heidelberg) mit Deckgläsern (Knittel Gläser, Braunschweig) eingedeckelt. Es folgte die Auszählung bei 1000-facher Vergrößerung von 2x100 Zellen mit Differenzierung von Makrophagen, Lymphozyten, Neutrophilen und Eosinophilen nach morphologischen Kriterien.

3.3.4 Restimulation der Milz und der mediastinalen Lymphknoten

Die entnommenen Milzen und drainierenden Lungenlymphknoten (LN) (3.3.2) wurden zwischen zwei Objektträgern (Typ Elka, Hecht-Assistent, Sondheim) mit R10 Medium (3.2.1) in einer Petrischale (0,9cm Durchmesser, Sarstedt, Nümbrecht) zerrieben. Die Zellsuspension wurde mit einer 10ml Pipette (Greiner bio-one, Frickenhausen) in ein 15ml Zentrifugenröhrchen aus Polypropylen (Falcon, Greiner, Frickenhausen) überführt. Die Petrischale wurde nochmals mit ca. 5ml R10 Medium gespült und diese Flüssigkeit ebenso in das Falcon gegeben. Die Lösung wurde für 5 Minuten, bei 1200rpm (375g) und Raumtemperatur zentrifugiert (Zentrifuge Typ 3SR+, Heraeus, Hanau). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet der Milzen zur Lyse der Erythrozyten mit 4ml 1,6% Ammoniumchlorid-Lösung (NH_4Cl_2) (3.2.3) und ca. 4ml PBS (phosphatgepufferte Kochsalzlösung) resuspendiert. Nach einer Inkubationszeit von 2 - 3 Minuten bei Raumtemperatur wurde die Reaktion mit 2ml PBS gestoppt. Die Milzzellen wurden erneut für 5 Minuten, bei 1200rpm (375g) und Raumtemperatur zentrifugiert und der Überstand verworfen. War die Lyse der Erythrozyten erfolgreich, war das Zellpellet grau. War dies nicht gegeben, so wurde der Schritt mit Ammoniumchlorid wiederholt. Das Pellet der LN- und der Milz-Zellen wurde in 10ml R10 Medium resuspendiert und die Zellzahl bei einer 1:10 Verdünnung (90 μ l Trypanblau (Sigma-Aldrich, Deisenhofen) + 10 μ l Zellsuspension) bestimmt. Nach steriler Filtration der Zellen durch ein 70 μ m Zell-Filter (Becton-Dickinson, Heidelberg) wurden die Zellen in eine Konzentration von 4×10^6 Zellen/ml verdünnt. Bevor die Zellen in eine 96-well Zell-Kulturplatte (Flachboden, Greiner bio-one, Frickenhausen) ausgesät wurden, wurde das OVA-Peptid (327-339) (Friedrich-Alexander Universität Erlangen-Nürnberg, Arbeitsgruppe Becker) in der Platte in R10 Medium verdünnt, so dass es in den Konzentrationen von 3 μ M, 1 μ M und 0 μ M vorlag. Es wurden dabei pro Probe Dreifachansätze

durchgeführt. Anschließend wurde in jedes Well 100 μ l der 4x10⁶/ml konzentrierten Zellsuspension pipettiert und die Platten für drei Tage bei 37°C in den Brutschrank (Hera cell 240, Thermo Fisher Scientific) gelegt. Nach dieser Zeit wurden die 96-well Platten für 5 Minuten, bei 1200rpm (375g) und Raumtemperatur zentrifugiert und die Überstände in 1,5ml Reaktionsgefäße (Sarstedt, Nümbrecht) überführt. Dabei wurden die Dreifachansätze gepoolt. Bis zum Analysieren der Überstände im ELISA wurden die Proben bei -20°C eingefroren.

3.3.5 Histologie der Lunge

Zur Beurteilung der Inflammation, wurden die Lungen der Mäuse 3.3.2, die in 4% Paraformaldehyd (3.2.2) eingelegt waren, in einem Gewebeeinbettautomat (Shandon *Citadel*[®], Thermo Fisher Scientific, Bonn) entwässert und anschließend in Einbettförmchen aus Edelstahl (R. Langenbrinck, Labor- und Medizintechnik, Emmendingen) in Paraffinblöcke eingegossen. Nach Auskühlung der Proben, wurden diese aus dem Metallgitter entnommen und mit dem Mikrotom (Microm International GmbH, Walldorf) in 4 μ m Scheiben geschnitten. Die Schnitte wurden in ein 58°C heißes Wasserbad (Medax, Nagel GmbH, Kiel) gelegt und auf einen Objektträger (Typ Superfrost, Hecht-Assistent, Sondheim) aus dem Wasserbad heraus aufgezogen. Die Proben trockneten anschließend bei 37°C über Nacht. Am folgenden Tag wurden die Proben in einem Färbeautomat (Jung Autostainer XL, Leica, Milton Keynes) Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbt, getrocknet und mit Hilfe von Flouromount (Serva, Heidelberg) mit Deckgläsern (Knittel Gläser, Braunschweig) eingedeckelt.

Zur weiteren Beurteilung wurden die Proben im Lichtmikroskop (Mikroskop Axiovert 40 C, Zeiss, Oberkochen) mit dem Objektiv

A-Plan, 10x/0,25 PH1 analysiert und die Schnitte mit einer Digitalkamera von Canon (7.1 Mega Pixels A 620, Krefeld) im 1,5-fachen Digitalzoom fotografiert.

3.3.6 Messung der Zytokine

Für die Bestimmung der Zytokine IFN γ , IL-10 und IL-13 aus dem Serum (3.3.2), aus den Überständen der Bronchoalveolaren Lavage (3.3.2) und den restimulierten Milz- und Lungen-Lymphknoten-Zellen (3.3.4) wurden die jeweiligen ELISA nach Herstellerangaben durchgeführt.

Tabelle 3.13 Zytokin - ELISA

Zytokin	ELISA-Anbieter
Mouse IFN γ ELISA Set	Becton-Dickinson, Heidelberg
Mouse IL-10 ELISA Set	Becton-Dickinson, Heidelberg
Mouse IL-13 ELISA Ready-Set GO!	EBioscience, Frankfurt

Die Proben wurden anschließend im ELISA-Reader (Molecular Devices) gemessen und mit dem Programm EXCEL (Microsoft®) bzw. PRISM 4 (Graph Pad Software) ausgewertet.

3.4 Toleranztherapie Maus

Die Toleranztherapie der weiblichen Balb/c Mäuse wurde stets als präventive Behandlung, vor der Induktion des allergischen Asthmas (3.3.1) durchgeführt. Ziel der Therapie war es, die Symptome der Allergie unterdrücken zu können.

Pro Versuch wurden stets vier Mäuse mit Placebo-Pflaster versehen. Bei zwei von diesen wurde anschließend allergisches Asthma (Positivkontrolle) ausgelöst. Die anderen beiden wurden als Negativkontrolle entsprechend ohne OVA Protein behandelt. Des Weiteren erhielten jeweils drei Tiere pro Versuchsgruppe das Verum-Pflaster mit anschließender Asthma-Induktion.

Die verwendeten Pflaster waren durchsichtig, hypoallergen und elastisch (*Fixomull*® transparent, BSN medical, Hamburg). Dies hatte den Vorteil, dass sie den Mäusen die nötige Bewegungsfreiheit im abdominalen Bereich ermöglichten. Zudem konnte das Einziehen der Creme in die Haut beobachtet werden. Das Therapie-Pflaster wurde mit der Allergen- oder Placebo-Creme wie unter 3.2.10 und 3.2.11 beschrieben, hergestellt. Die Mäuse wurden narkotisiert (3.2.4) und am Rücken mit einem Rasierapparat (D4D-Combo, Andis Company, USA), ohne Erzeugung von Hautreizungen und Wunden, auf einer Fläche von ca. 1 x 2cm rasiert. Die rasierte Stelle wurde desinfiziert und getrocknet. Im Anschluss daran wurde das Creme-Pflaster exakt auf die rasierte Stelle gelegt und vorsichtig angedrückt. Das Pflaster wurde komplett um den Körper der Maus gewickelt und zum Schutz vor dem Anknabbern mit einem weiteren gleich großen Pflaster umklebt. Die Mäuse bekamen einen Tropfen Liquifilm® (Allergan, Apotheke) zum Schutz der Kornea vor Austrocknung in die Augen getropft und wurden in einem komplett mit Zellstoffpapier ausgelegten Käfig zurück gelegt. Die Therapie wurde zehn Tage durchgeführt, wobei nach ca. drei Tagen eine Erneuerung des Pflasters unter Narkose notwendig war. Das Zellstoffpapier wurde bei dieser Gelegenheit stets erneuert. Am Tag nach der endgültigen Pflasterentfernung wurde die Induktion des OVA-allergischen Asthmas begonnen (3.3.1).

3.5 Allgemeine und spezielle Haut-Untersuchung des Pferdes

Alle Pferde wurden vor der Blutentnahme und vor Durchführung der Therapie ausführlich nach den 13 Punkten der Allgemeinuntersuchung von DEEGEN und GLITZ (2002) untersucht.

1. Körperhaltung
2. Verhalten
3. Ernährungszustand
4. Pflegezustand
5. Habitus
6. Atemfrequenz
7. Pulsfrequenz
8. Körpertemperatur
9. Nasenausfluß
10. Spontaner Husten und Auslösung des Hustenreflexes
11. Unterkieferlymphknoten
12. Sichtbare Schleimhäute
13. Herz-/Lungenauskultation (Übersicht)

War das Allgemeinbefinden des Pferdes ungestört, wurde eine ausführliche Betrachtung der Haut durchgeführt. Es wurden alle Hautareale mit typischen allergischen Symptomen notiert und nach Schweregrad klassifiziert.

3.6 Blutanalyse Pferd

3.6.1 Blutentnahme beim Pferd

Das Blut wurde stets nach eingehender Allgemeinuntersuchung, steril am Hals aus der gestauten Vena jugularis gewonnen. Dazu wurde die Injektionsstelle mit Desinfektionsmittel (*Cutasept*® med F, Bode Chemie GmbH, Hamburg) gereinigt, die Vene gestaut und anschließend eine Kanüle (*S – Monovette*® 20G x1 $\frac{1}{2}$ ", Sarstedt, Nümbrecht) eingeführt. Das Blut wurde in je zwei Vakutainerröhrchen (9ml, EDTA-KE Zusatz 15% 0,12ml, Sarstedt, Nümbrecht) zur Separation der Blutzellen und einem Vakutainerröhrchen (9ml, neutral, Sarstedt, Nümbrecht) zum Erhalt von Serum aufgefangen. Nach Entfernen der Kanüle wurde die Vena jugularis noch 1 Minute oberhalb der Injektionsstelle gestaut und die Haut neben der Einstichstelle zum sicheren Wundverschluss verstrichen.

3.6.2 Blutbearbeitung

Das Vorgehen der Blutbearbeitung basiert in großen Teilen nach dem Protokoll von KAUL (1998). Es wurde lediglich in kleinen Teilen verändert.

Serumgewinnung

Das Blut in den Vakutainerröhrchen (9ml, neutral, Sarstedt, Nümbrecht) wurde bei Raumtemperatur gelagert, bis ein Blutkuchen entstand. Dieser Blutkuchen wurde mit einer Pasteurpipette (Brand,

Wertheim) entfernt und das Serum in ein 1,5ml Reaktionsgefäß (Sarstedt, Nümbrecht) pipettiert. Das Serum wurde bei Raumtemperatur 10 Minuten bei 5100rpm (2500g) zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand in ein neues, steriles 1,5ml Reaktionsgefäß überführt und zur Lagerung bei -20°C eingefroren.

Überführung des Vollbluts; Durchführung des Blutausstrichs

Das in den Vakutainerröhrchen (9ml, EDTA-KE Zusatz, Sarstedt, Nümbrecht) enthaltene gewonnene Vollblut wurde bei Raumtemperatur transportiert und über Nacht steril in ein 50ml Zentrifugenröhrchen (Falcon, Geiner, Frickenhausen) überführt, welches mit FCS beschichtet wurde. Aus dem, im Vakutainerröhrchen verbliebenen Blut wurde am Tag der Blutentnahme mit einer 10 μ l Pipette ein Tropfen Blut auf einen Objektträger (Typ Superfrost, Hecht-Assistent, Sondheim) aufgebracht. Der Tropfen wurde mit einem zweiten Objektträger (Typ Elka, Hecht-Assistent, Sondheim) ausgestrichen und zum Trocknen offen gelagert. Anschließend wurden die Proben nach Anleitung mit DiffQuick[®] - Färbelösung (Medion Diagnostics, Düringen) gefärbt, getrocknet, mit Fluoromount (Serva, Heidelberg) bestrichen und ein Deckgläschen darüber geklebt. Nach erneuter Trocknung konnten die Blutzellen am Mikroskop mit einem Ölimmersionsobjektiv bestimmt werden. Dies diente der Differenzierung der Leukozyten.

Leukozytenzählung im Vollblut

In einer separaten 96-well Zellkultur-Platte (Flachboden, Greiner bio-one, Frickenhausen) wurden für jede Blutprobe 90 μ l Türkische Lösung (Merck, Darmstadt) vorgelegt. Das Restblut aus den Vakutainerröhrchen (9ml, EDTA-KE Zusatz) wurde kurz geschüttelt

und 10 μ l davon in die vorgelegte Türksche Lösung pipettiert. Diese Suspension wurde ca. 2 Minuten per Hand geschüttelt, was zur weitgehenden Erythrozyten-Lyse führte. Anschließend wurde die Blutprobe in einer Neubauer Zellzählkammer unter dem Mikroskop (Mikroskop Axiostar plus, Zeiss, Oberkochen) gezählt und damit die Leukozytenzahl der Blutprobe ermittelt.

3.6.3 Zellseparation

Zur Gewinnung der Pferdeblut-Granulozyten wurde das von DIETZE (2009) beschriebene Protokoll verwendet und nur geringfügig verändert. Zur Zellseparation wurde das in den EDTA-Vakutainer-Röhrchen (Sarstedt, Nümbrecht) enthaltene Blut steril in ein FCS-beschichtetes 50ml Zentrifugengefäß (Falcon, Greiner, Frickenhausen) gefüllt, wenn es nicht am selben Tag verarbeitet wurde und max. 24 Stunden bei Raumtemperatur gelagert.

Als erster Schritt der Zellseparation wurde das Blutplasma entfernt. Dafür zentrifugiert man das Blut bei Raumtemperatur 15 Minuten und 1800rpm (750g) (Hareus Multifuge 3sr+, Hanau) und entfernte das gesamte Plasma mit einer weitleumigen 10ml Pipette (Greiner bio-one, Frickenhausen). Das Zellpellet wurde mit 30ml ungekühltem, sterilem PBS resuspendiert und 10ml *Biocoll*® (1,09g/ml; Biochrom AG, Berlin) langsam unterschichtet. Es durfte dabei zu keiner Durchmischung des *Biocolls*® und der Zellsuspension kommen. Nach 20 Minuten Zentrifugation bei Raumtemperatur und 1600rpm (500g) ohne Bremse wurde die Interphase, in der sich die Leukozyten befanden, mit einer 10ml Pipette in ein neues 50ml Röhrchen überführt und in 30ml PBS mit 2% EDTA (3.2.8) gewaschen (Zentrifugieren: 5 Minuten, Raumtemperatur, 1200rpm (375g)). Der Überstand wurde entfernt und das Zellpellet mit 30ml PBS resuspendiert. Unter diese Zellsuspension wurde 10ml *Ficoll*® (1,077g/ml; Fresenius, Bad Homburg) langsam geschichtet und erneut 20 Minuten bei 1600rpm (500g), ohne Bremse, bei Raumtemperatur zentrifugiert. Dieses Mal

waren in der Schwebephase fast ausschließlich Monozyten und Lymphozyten zu finden. In dem Zellpellet des Falcons befanden sich vor allem die granulozytären Zellen und die restlichen Erythrozyten. Da für den folgenden Restimulationstest nur die granulozytären Zellen benötigt wurden, entfernte man den gesamten Überstand inklusive der Monozyten und Lymphozyten. Das Pellet wurde mit 50ml ungekühltem PBS resuspendiert. Zum Entfernen des restlichen Ficolls® wurde die Zellsuspension gewaschen, indem sie erneut 5 Minuten bei 1200rpm (375g) und Raumtemperatur zentrifugiert und der Überstand verworfen wurde. Zur weiteren Verwendung für die Restimulation wurde das Zellpellet mit 2ml ungekühltem PBS wieder in Lösung gebracht. Zur Kontrolle wurde die Zellzahl berechnet, indem 10 μ l der Blutprobe mit 90 μ l Trypanblau gemischt wurden und in einer Neubauer Zellzählkammer unter dem Mikroskop (biomed, Leitz, Wetzla) ausgezählt wurden.

3.6.4 Restimulation der Pferdegranulozyten

Die gewaschenen und mit 2ml ungekühlten, resuspendierten, granulozytären Zellen wurden je nach Restimulationsart, wie folgt weiter verarbeitet (nach Susanne Kaul). Der erhaltene Überstand wurde anschließend zur Bestimmung des Histamin-Gehalts im Histamin 'research ELISA' (LDN, Nordhorn) bestimmt.

Spontane Histaminfreisetzung (HS)

Zur Messung der physiologischen Histaminfreisetzung der granulozytären Zellen wurden 250 μ l ungekühltes Pipes B (3.2.7) als Puffer in einem 1,5ml Reaktionsgefäß mit 250 μ l der Zellsuspension (3.6.3) gemischt. Dieses Eppendorf Tube wurde für 1 Stunde in den Brutschrank (Hera cell 240, Thermo Electron Corporation, Heraeus) bei

37°C und 5% CO_2 gestellt. Im Anschluss daran wurde die Reaktion gestoppt, indem die Zellsuspension für 20 Minuten auf Eis gelegt wurde. Zur Gewinnung des Überstandes wurde das Eppendorf tube 10 Minuten, bei 2700rpm (700g) und Raumtemperatur zentrifugiert (Zentrifuge: Frescu 21 centrifuge, Thermo Electron Corporation, Heraeus), der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bis zur weiteren Analyse bei -20°C eingefroren.

Physikalische Histaminfreisetzung (HP)

Um die maximale Histaminfreisetzung der granulozytären Zellen eines Pferdes zu messen, wurden die Zellen mit 800 μ l ungekühltem Pipes B (3.2.7) als Puffer in einem 1,5ml Reaktionsgefäß (Eppendorf Tube, Sarstedt, Nümbrecht) mit 200 μ l der Zellsuspension (3.6.3) gemischt. Zur Denaturierung der Zellen wurde diese Suspension 10 Minuten bei 100°C in einem Wasserbad gekocht. Die Proben wurden anschließend bei 9300rpm (8300g), (Zentrifuge: Frescu 21 centrifuge, Thermo Electron Corporation, Heraeus), bei Raumtemperatur für 3 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein steriles Reaktionsgefäß überführt und bei -20°C für die weitere Auswertung aufgehoben.

Allergen-induzierte Histaminfreisetzung (HA5)

Zur spezifischen Messung der Histaminmenge, die durch das Allergen freigesetzt wurde, pipettiert man in 250 μ l ungekühltes Pipes B (3.2.7) die gewünschte Menge an Allergen. Zur Analyse der Allergie gegen die Kriebelmücke wurden 5 μ g der unter 3.2.9 beschriebene *Culicoides*-Protein-Lösung sorgfältig mit dem Pipes B gemischt. Im Anschluss daran wurde 250 μ l der Zellsuspension (3.6.3) dazugegeben und erneut vermengt. Diese Probe wurde für 1 Stunde in den

Brutschrank (Hera cell 240, Thermo Electron Corporation, Heraeus) bei 37°C und 5 % CO₂ gestellt und anschließend, zum Stoppen der Reaktion, für 20 Minuten auf Eis gelegt. Zur Gewinnung des zellfreien Überstandes wurde das Reaktionsgefäß 10 Minuten, bei 2700rpm (700g) und Raumtemperatur zentrifugiert (Zentrifuge: Frescu 21 centrifuge, Thermo Electron Corporation, Heraeus). Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß pipettiert und bis zur weiteren Analyse bei -20°C eingefroren.

3.6.5 'Histamin Research ELISA'

Der 'Histamin Research ELISA' wurde von der Firma LDN, Labor Diagnostika Nord GmbH & Co.KG, Nordhorn, für die Histaminmessung verschiedener, gesunder Tiere entwickelt (Maus, Ratte, Katze, Hund, Pferd). Zur Etablierung des Histamin-ELISAS, für die Messung des Histamins allergischer Tiere, führte LDN den ELISA für den Überstand der restimulierten granulozytären Zellen von Pferden (3.6.4) nach Packungsanleitung durch:

Zur Messbarkeit des Histamins wurden die Proben zunächst azyliert, um nach einem Waschschrift mit einem Enzym Konjugat versehen zu werden. Unter Zugabe des Substrates und der Stopplösung konnte der Histaminwert mit Hilfe eines ELISA readers (Molecular Devices, USA) bei einer Wellenlänge zwischen 620nm und 650nm gemessen werden.

3.7 Toleranztherapie Pferd

Alle an der Studie teilnehmenden Sommererkzemer-Pferde wurden während der Allergiezeit (April-Oktober) klinisch untersucht und dabei die Allergiesymptom-Stärke in ein Klassifizierungs-System

eingetragen. In der Zeit, in der keine Allergiesymptome auftraten (November-März), wurde die Allergietherapie durchgeführt.

3.7.1 Symptom-Evaluierung

Zu Beginn einer jeden Studie und im Sommer nach der Therapie wurden Symptom-Evaluierungen durchgeführt. Dabei wurde die Haut des Pferdes untersucht und die Körperstellen notiert, an denen deutliche Exkorationsstellen zu sehen waren. Zudem fand eine Befragung der Besitzer über den Verlauf der Symptome statt. Folgende Einteilung der Krankheitsstufen wurde nach der Untersuchung vorgenommen:

Tabelle 3.14 Symptom-Klassifizierung

Klassifizierung	Erläuterung
1	milde Symptome (nur Mähnenkamm und Ohren, Bauchnaht oder Schweifrübe betroffen. Keine blutenden Wunden)
2	moderate Symptome (Mähnenkamm, Ohren, Bauchnaht und Schweifrübe betroffen. Keine blutenden Wunden)
3	starke Symptome (Mähnenkamm, Ohren, Bauchnaht, Schweifrübe und Beine betroffen. Vereinzelt blutende Wunden)
4	sehr starke Symptome (gesamter Körper betroffen. Vielzahl an blutenden, evtl. eiternden Wunden)

Ziel der Klassifizierung war es, die Pferde vor der Therapie in eine Krankheitsstufe einteilen und nach der Studie einen Therapieerfolg quantifizieren zu können.

3.7.2 Toleranz-Therapie

Zu Beginn der Toleranz-Therapie wurden die Pferde eingehend allgemein untersucht und speziell auf Veränderungen an den Beinen geachtet. War das linke Hinterbein ohne entzündliche oder pathologische Veränderungen, so wurde das Röhrbein (Os metacarpale III) cranial im Bereich des Corpus os metacarpale III auf einer Fläche von 5 x 5cm rasiert (Rasierapparat, Ceramic Edge, 0,5mm, Andis Company). Wurde die Haut des Beines durch das Rasieren verletzt oder gab es krankheitsbedingte Gründe das Bein nicht zu verwenden, wurde ein anderes Bein gewählt. Bevorzugt wurden die Hinterbeine, da diese mit dem Maul nicht leicht zu erreichen sind und das Therapie-Pflaster somit nicht entfernt werden konnte. Nach der Rasur wurde die Stelle gesäubert und die Allergencreme (3.2.10) oder die Placebocreme (??), je nach Gruppenzugehörigkeit des Tieres, mit Hilfe eines Spatels (Laborbedarf) aufgetragen. Zum Schutz der Allergencreme und zur Erzeugung von Okklusion wurde um das Bein ein Pflaster geklebt (*Fixomull*® transparent, BSN medical, Hamburg). Das Pflaster saß perfekt, wenn es zu keiner Einschränkung des Bewegungsapparates kam. Nach einer Woche konnte das Pflaster durch manuelles Weiten entfernt werden. Nach Säuberung der rasierten Stelle mit Desinfektionsmittel (*Cutasept*® med F, Bode Chemie GmbH, Hamburg) und eingehender Untersuchung, konnte eine neue Cremelösung aufgetragen und mit einem weiteren Pflaster geschützt werden. Die Therapie wurde im Winter 2009 über acht Wochen ausgeführt und im Winter 2010 über sechs Wochen.

3.8 Statistik

Die in dem Ergebnisteil abgebildeten Graphen wurden mit der jeweiligen Standardabweichung dargestellt. Zur Berechnung der Signifikanz wurde das Statistikprogramm Prism 4 für Macintosh, Version 4.0a, (Graph Pad Software) verwendet. Zur Analyse eines ein-faktoriellen, unabhängigen, normalverteilten Tests, wurde die Berechnung nach ANOVA durchgeführt. War der Test nicht normalverteilt, wurde der Kruskal-Wallis-Test gewählt. Stellten sich nach dem Kruskal-Wallis-Test signifikante Unterschiede heraus, wurde zur Post-hoc Analyse im paarweisen Einzelvergleich der Dunns-Test verwendet. Die Einführung in das Statistikprogramm erfolgte durch Johannes Hain, Studentische Statistische Beratung der Julius-Maximilians-Universität Würzburg.

3.9 Verzeichnis der Geräte, Verbrauchsmaterialien und Reagenzien

Tabelle 3.15 Geräte 1

Geräte	Anbieter
Abzug	Laborfachhandel
Accu-jet pro	Brand, Wertheim, D
Analysenwaage, Typ SBA 32	Denver Instrument, Göttingen, D
Becherglas	Laborbedarf
Brutschrank, Hera cell 240	Thermo Fisher Scientific, Bonn, D
Einbettförmchen aus Edelstahl	R. Langenbrinck, Labor- und Medizintechnik, Emmendingen, D
Einfachspannplatte mit Ring für Zytospin	Hettich, Tuttlingen, D
Eismaschine	Scotsman, Mailand/Italien
ELISA-Reader	Molecular Devices, USA
ELISA-Washer	Tecan, Vienna, Virginia, USA
Facs-Scan	Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
Fantaschale	Apotheke
Färbeautomat, Jung Autostainer XL	Leica, Milton Keynes, UK
Foto-Kamera 7.1 Mega Pixels A 620	Canon, Krefeld, D
Foto-Kamera AxioCamMRm	Zeiss, Oberkochen, Wetzlar, D
Gewebeeinbettautomat	Shandon <i>Citadel</i> ®, Thermo Fisher Scientific, Bonn, D
Handy-Step	Brand, Wertheim, D
Heizplatte	Einzelhandel
Heat-Sealer 1295-012	Wallac, Turku, Finnland
Kochtopf	Einzelhandel
Laborwaage (KB 1200-2)	Kern, Balingen, D
Magnetrührer, Combi mag Ret	IKA, Staufen, D
Mikroskop Axiostar plus	Zeiss, Oberkochen, Wetzlar, D
Mikroskop Axiovert 40 C	Zeiss, Oberkochen, Wetzlar, D
Mikroskop Axiovert 200 M	Zeiss, Oberkochen, Wetzlar, D
Mikrotom	Microm International GmbH, Walldorf, D

Tabelle 3.16 Geräte 2

Geräte	Anbieter
Objektiv Plan heoflor 20x	Zeiss, Oberkochen, Wetzlar, D
PH-Meter, HI9321	Hanna Instruments, Kehl am Main, D
Pinzette	Hebu, Tuttlingen, D
Pipetten, einstellbar 100-1000 μ l, 20-100 μ l, 1-20 μ l	Brand, Wertheim, D
Pastille	Apotheke
Rasierapparat, D4D-Combo, Maus	Andis Company, USA
Rasierapparat, Ceramic Edge, 0,5mm Pferd	Andis Company, USA
Röhrchen-Schüttler Typ Mixomat	Boskamp GmbH, D
Schere	Braun, Aesculap, Tuttlingen, D
Spatel	Laborbedarf
Spektralphotometer, nanodrop	Peqlab, Erlangen, D
Sterilbank, MSC advantage	Thermo scientific, Bonn, D
Transferpipette-8 10-100 μ l	Brand, Wertheim, D
Umkehrosmoseanlage	Millipor, Schwalbach, D
Vortexer, Vortex-Genie TM	Bender + Hebein AG, Bruchsal, D
Wasserbad	Medax, Nagel GmbH Kiel, D
Zellzählkammer nach Neubauer	Labor Optik, Neubauer, Marienfeld, D
Zentrifuge Typ Fresco 21	Heraeus, Hanau, D
Zentrifuge Typ 3SR+	Heraeus, Hanau, D
Zentrifuge Typ 3S+	Heraeus, Hanau, D
Zentrifuge Universal 320	Hettich, Tuttlingen, D
Zytowinkelkammer (Durchmesser 6,2mm)	Hettich, Tuttlingen, D

3. Material und Methoden

Tabelle 3.17 Verbrauchsmaterial

Verbrauchsmaterial	Anbieter
Adapter für Vakutainerröhrchen	Sarstedt, Nümbrecht, D
Deckgläser	Knittel Gläser, Braunschweig, D
Dreiwegehahn Discifix-3	Braun, Tuttlingen, D
Einmalkanülen, 0,5x16mm, steril	Braun, Tuttlingen, D
Einmalkanülen, 0,42x19mm, steril	Braun, Tuttlingen, D
Elisa-Platten, 96-well, flachboden, hochaffin	Costar, USA
Facs-Tubes	Hartenstein, Würzburg, D
Filterkarten für Zytowinkelkammer	Hettich, Tuttlingen, D
<i>Fixomull</i> ® transparent	BSN medical, Hamburg, D
Kanüle für S – <i>Monovette</i> ® 20G x1 $\frac{1}{2}$ ''	Sarstedt, Nümbrecht, D
Kryoröhrchen, 2ml mit Schraubverschluss	Sarstedt, Nümbrecht, D
Objektträger, Typ Superfrost	Hecht-Assistent, Sondheim, D
Objektträger Typ Elka	Hecht-Assistent, Sondheim, D
Pasteurpipetten, 150mm	Brand, Wertheim, D
PD10-Säulen, Sephadex TM G-25M GE	Healthcare, München, D
Petrischalen, 0,9cm Durchmesser	Sarstedt, Nümbrecht, D
Pipettenspitzen, blau, gelb und kristall	Roth, Karlsruhe, D
Pipetten 5ml, 10ml, 25ml	Greiner bio-one, Frickenhausen, D
Präzisions Dispenser-Tips 1,25ml, 5ml, 12,5ml	Braun, Tuttlingen, D
Reaktionsgefäße, 1,5ml	Sarstedt, Nümbrecht, D
Spritzen steril, 1ml Luer solo	Braun, Tuttlingen, D
Spritzen steril, 2ml Luer Lock	Braun, Tuttlingen, D
Vakutainerröhrchen, 9ml,	
EDTA-KE Zusatz (15% 0,12ml)	Sarstedt, Nümbrecht, D
Vakutainerröhrchen, 9ml, neutral	Sarstedt, Nümbrecht
Venenverweilkatheter, BD <i>Venflon</i> ™	
Pro, G20, 1,1x 32mm	Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ USA
Zentrifugenröhrchen, 15ml	
aus Polypropylen (Falcons)	Greiner, Frickenhausen, D
Zentrifugenröhrchen, 50ml	
aus Polypropylen (Falcons)	Geiner, Frickenhausen, D
Zell-Filter, 70µm	Becton-Dickinson, Heidelberg, D
Zell-Kulturplatte, 96-well, Flachboden	Greiner bio-one, Frickenhausen, D
Zell-Kulturplatte, 96-well, Rundboden	Nunc, Roskilde, Dänemark, D

Tabelle 3.18 Reagenzien

Reagenzien	Anbieter
Accustain (Färbelösung nach Wright, modifiziert)	Sigma, Deisenhofen, D
Alu-Gel-S Suspension (reinst steril)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, D
Ammoniumchlorid-Lösung 10%, (NH_4Cl_2)	AppliChem Biochemica, Darmstadt, D
Ammoniumhydrogencarbonat (NH_4HCO_3)	Merck, Darmstadt, D
Biocoll (1,09g/ml)	Biochrom AG, Berlin, D
ß-Mercaptoethanol	Sigma, Deisenhofen, D
Calciumchlorid ($CaCl_2 + 2H_2O$)	Ferak, Berlin, D
<i>Culicoides nubeculosus</i> -Lyophilisat	Greer source material, Lenoir, USA
DAC Basiscreme	Apotheke
Desinfektionsmittel, Cutasept® med F	Bode Chemie GmbH, Hamburg, D
Diff Quick® - Färbelösung	Medion Diagnostics, Düringen, D
EDTA	Sigma, Deisenhofen, D
FCS (hitzeinaktiviertes fetales Kälberserum)	PAA, Pasching, A
Fluoromount	Serva, Heidelberg, D
Glutamin (L-Glutamin)	Sigma, Deisenhofen, D
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt, D
Magnesiumchlorid ($MgCl_2 + 6H_2O$)	Ferak, Berlin, D
Natriumacid	Sigma, Deisenhofen, D
Natriumchlorid ($NaCl$)	AppliChem GmbH, Darmstadt, D
Natriumhydroxid ($NaOH$)	Carl Roth GmbH+Co, Karlsruhe, D
Ovalbumin – Protein	Sigma, Deisenhofen, D
Ovalbumin – Peptid (327-339)	Universität Erlangen-Nürnberg, AG Becker, D
Ovalbumin – Peptid (327-339)	ActivoTec, Cambridge, UK
Paraformaldehyd	Sigma, Deisenhofen, D
Penicillin/Streptomycin	Sigma, Deisenhofen, D
Ficoll® (1,077g/ml)	Fresenius, Bad Homburg, D
Phosphatgepufferte Kochsalzlösung, ohne Ca^{2+} , Mg^{2+}	Immunbiologie Würzburg, D
Pipes (Piperazine-N,N'-bis [2-ethanesulfonic] acid)	AppliChem GmbH, Darmstadt, D
RPMI 1640	Bio-Whittaker Cambrex, New Jersey, USA
Salzsäure, konzentriert (37%)	J.T. Baker, Großgerau, Nr. 6081
Trypanblau	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, D
Türksche Lösung	Merck, Darmstadt, D
Tween 20, Polyoxyethylensorbitanmonolaurat,	Sigma, Deisenhofen, D
Weißer Vaseline Lichtenstein DAB	Apotheke
Zellstoff	Verbrauchshandel

Tabelle 3.19 Arzneimittel

Arzneimittel	Anbieter
Augentropfen, Liquifilm [®]	Allergan, Apotheke
Ketamin, Ketavet [®] 10%	Medistar, Apotheke
Xylazin, Rompun [®] 2%	BayerHealthCare, Apotheke

Tabelle 3.20 ELISA-Kit

ELISA-Kit	Anbieter
'Histamin Research ELISA'	LDN Labor Diagnostika Nord GmbH & Co.KG, Nordhorn, D
IFN γ	Becton-Dickinson, Heidelberg, D
IL-4	Becton-Dickinson, Heidelberg, D
IL-5	EBioscience, Frankfurt, D
IL-10	Becton-Dickinson, Heidelberg, D
IL-13	EBioscience, Frankfurt, D

4 Ergebnisse

Die Wirksamkeit der epikutanen, allergenspezifischen Immuntherapie (EPIT) wurde bereits vor über 50 Jahren von BLAMOUTIER et al. (1959) beschrieben. Im Jahr 2009 konnte darüber hinaus eine Gruppe um Prof. Thomas Kündig (SENTI et al. (2009a)) zeigen, dass eine EPIT am Menschen erfolgreich verlaufen kann. Durch diese und weitere Hinweise lag unser Interesse daran, zu erforschen, wie eine Immuntherapie ohne Verletzung der Haut funktioniert. Zum einen wurde dies experimentell am Maus-Modell getestet, zum anderen als Placebo-kontrollierte Studie am Sommerekzem des Pferdes angewandt.

4.1 Epikutane Therapie am Maus-Asthma-Modell

Das murine Asthma-Modell (3.3.1) ist ein seit langem bekanntes und etabliertes, experimentelles Typ I Allergie-Modell. Es eignet sich zum einen, die Typ I Allergie immunologisch zu erforschen und zum anderen verschiedene Therapien zu testen. Aus diesem Grund wurde dieses Modell gewählt, um die Wirkung der epikutanen Toleranztherapie als prophylaktische Anwendung experimentell zu untersuchen.

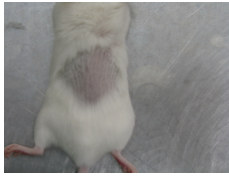
Die aus der Veröffentlichung von BYNOE et al. (2003) bekannte

Durchführung der Pflastertherapie wurde in einigen Details übernommen. Zum einen erschien es sinnvoll das Allergen nach einer Rasur zu applizieren, da dass Allergen direkt durch die Haut eindringen sollte. Zum anderen zeigte sich der Rücken als geeignete Applikationsstelle, da dort am wenigsten Verunreinigungen zu befürchten waren. Auch die von BYNOE et al. (2003) veröffentlichte, optimale Allergen-Dosis von $10\mu\text{g}$ wurde übernommen. Die Durchführung folgte nach dem unter 3.4 beschriebenen Verfahren.

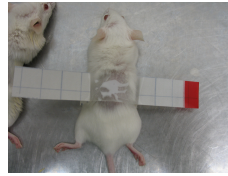
Im gesamten Verlauf der Studie wurden die Mäuse als Positivkontrolle bezeichnet, die ein Placebo-Pflaster erhalten haben und anschließend mit OVA immunisiert wurden. Die Negativkontroll-Tiere wurden ebenfalls mit einem Placebo-Pflaster behandelt. Sie bekamen kein OVA injiziert und hatten somit kein allergisches Asthma. Die Therapiegruppe erhielt das Wirkstoffpflaster mit anschließender OVA-Asthma Induktion.

4.2 Asthma Analyse

Einen Effekt der Therapie am Maus-Modell lässt sich anhand verschiedener Parameter feststellen. Zum einen kann die BAL zytologisch und der zellfreie Überstand auf den Zytokingehalt untersucht werden. Zum anderen ist es möglich, die Lungendrainierenden Lymphknoten- und die Milzzellen mit OVA-Peptid (327-339) in vitro zu restimulieren und im zellfreien Überstand die Zytokine zu messen. Eine weitere Untersuchungsmethode ist die Beurteilung der Lungen im HE gefärbten histologischen Schnitt.



(a) Rasur des Rückens



(b) Applikation des Pflasters



(c) Die EPIT ist fixiert

Abbildung 4.1 Pflaster-Therapie

Die Rasur am Rücken erfolgte unter Narkose. Auf den rasierten Bereich wurde das Pflaster mit der Allergen- oder Placebocreme gedrückt, um die Maus gewickelt und ein weiteres Pflaster zum Schutz darüber versehen. Nach jeweils drei Tagen erfolgte ein Pflasterwechsel und nach zehn Tagen ein endgültiges Entfernen.

4.2.1 Zytologische Analyse der BAL

Durch das Gewinnen der BAL, nach der unter 3.3.2 beschriebenen Methode, ist es möglich einen Einblick über den Zustand der Lunge und dem Ausmaß des Asthmas zu erhalten. Laut dem Buch 'Labor-diagnostik' von KRAFT und DÜRR (1999) ist die BAL die Untersuchungsmethode, bei der Zustand und Funktion des respiratorischen Epithels und die Abwehrzellen im Alveolar- und Bronchialbereich beurteilt werden können. Zur Erhaltung eines Überblicks wurde

4. Ergebnisse

die Gesamtzellzahl der BAL der jeweiligen Behandlungsgruppe ausgewertet und ist in der Abbildung 4.2 zu sehen. Es wurde dabei die Positiv-, von der Negativkontrolle und der Therapiegruppe unterschieden.

In der Therapiegruppe war, im Vergleich zu den beiden Kontrollgruppen, eine höhere Zellzahl vorzufinden, die aber nur signifikant im Hinblick auf die Negativkontrolle war.

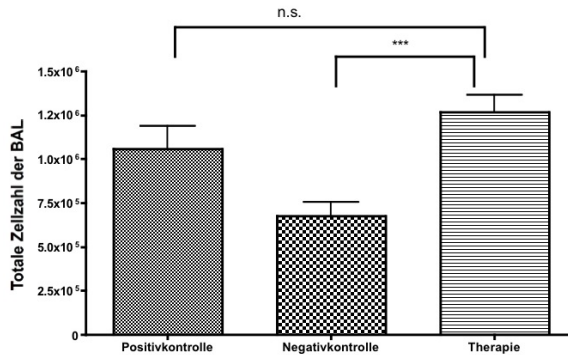


Abbildung 4.2 Totale Zellzahl der BAL

Die totale Zellzahl der BAL wurde zum einen bei Mäusen der Positivkontrolle bestimmt, bei denen nach einer Pflastertherapie ohne Wirkstoff allergisches Asthma induziert wurde. Zum anderen wurde die Zellzahl bei Tieren der Negativkontrolle gezählt, bei denen nach einer Placebotherapie kein Asthma ausgelöst wurde. Außerdem ist die totale Zellzahl der Therapietiere zu sehen, die nach einer Verum-Pflastertherapie mit OVA-Peptid allergisches Asthma induziert bekamen. Signifikante Unterschiede sind zwischen der Negativkontrolle und der Therapiegruppe zu finden.

Positivkontrolle (pos) $n=15$, Negativkontrolle (neg) $n=15$, Therapiegruppe $n=21$; *** $p < 0,001$.

Bei der zytologische Untersuchung der BAL (3.3.3) konnte festgestellt werden, dass die meisten Zellen in der Therapiegruppe Makrophagen waren. Ein Großteil der Zellen sind sowohl in der Positivkontrolle, als auch in der Therapiegruppe die eosinophilen Granulozyten (Abb. 4.3). In geringerer Anzahl sind darüber hinaus neutrophile Granulozyten und Lymphozyten zu erkennen. Diese Zellpopulationen sind in dieser Häufung ohne pathologischen Befund. In der Negativkontrolle sind vor allem Makrophagen zu finden. Hier besteht ein signifikanter Unterschied zu der Makrophagen-Anzahl der Positivkontrolle und der der Therapiegruppe. Alle anderen Unterschiede sind nicht signifikant.

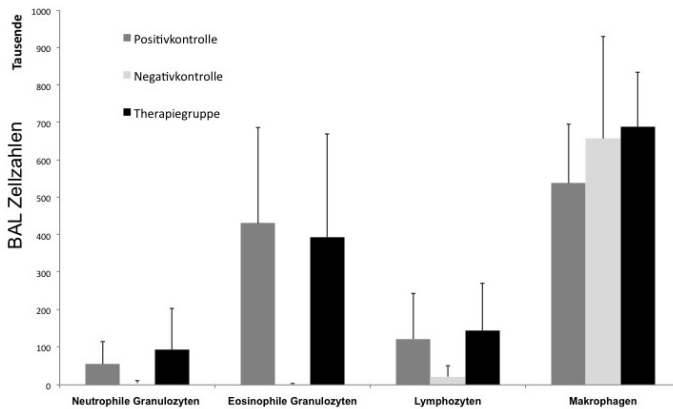


Abbildung 4.3 Zelltypen der BAL

Die Zellen der BAL der Positivkontrolle (Placebopflaster, allergisches Asthma), der Negativkontrolle (Placebopflaster, kein allergisches Asthma) und der Therapiegruppe (Verumpflaster, allergisches Asthma) wurden im Zytospin bearbeitet, mit DiffQuick[®] gefärbt und die gesamte Zellpopulation (2x 100 Zellen) nach morphologischen Merkmalen unter dem Mikroskop ausgezählt. Es folgte eine Hochrechnung auf die Gesamtzellzahl. In der Abbildung sind die totale Anzahl der neutrophilen Granulozyten, der eosinophilen Granulozyten, der Lymphozyten und der Makrophagen zu sehen.

Positivkontrolle n=15, Negativkontrolle n=15, Therapiegruppe n=21

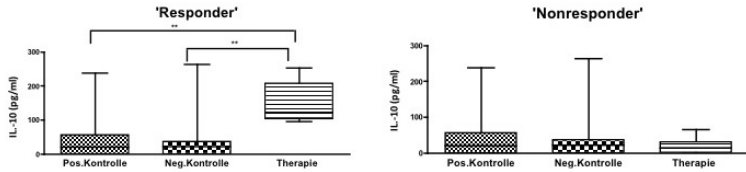
4.2.2 Zytokine der BAL

Zur weiteren Analyse des immunologischen Geschehens in der Lunge der Maus wurden verschiedene Zytokine im zellfreien Überstand der BAL gemessen. Zum Erfassen des Status der Tr1 Zellen wurde das Interleukin IL-10 der BAL gemessen. Dieses Zytokin führt unter anderem zur Aktivierung von Toleranzmechanismen (MEILER et al. (2008)). Eine erhöhte Ausschüttung von IL-10 wird als Zeichen einer erfolgreichen Immuntherapie gewertet (LLOYD und HAWRYLOWICZ (2009)). Als ein weiteres relevantes Zytokin wurde IL-13 im Überstand gemessen. IL-13 ist ein klassisches Zytokin, dass von Th2 Zellen freigesetzt wird und der Beurteilung des Schweregrades der Allergie dient (HAMMAD und LAMBRECHT (2008)). Des Weiteren wurde die ausgeschüttete Menge $\text{IFN}\gamma$ detektiert, welches vor allem bei Th1 Reaktionen freigesetzt wird. Kommt es zu einer vermehrte Ausschüttung dieses Interferons kann dies ein Zeichen für eine Immundeviation sein. Die Zytokine der BAL wurden in der Positiv-, der Negativkontrolle und der Therapiegruppe gemessen.

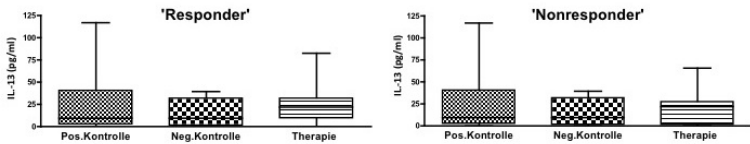
Bei der Analyse der Zytokine stellte sich heraus, dass es bei den Therapietieren sog 'Responder' und 'Nonresponder' gegeben hat. Als 'Responder' wurden die Tiere gewertet, bei denen ein höherer Wert des Zytokins IL-10 gemessen werden konnte, als der Mittelwert der Positivkontrolle. Diese Tiere wurden auch bei allen anderen Zytokinen als 'Responder' bezeichnet. Diese Einteilung ist auf die Publikation von AKBARI et al. (2001) zurückzuführen. Sie zeigten, dass unter anderem die Freisetzung von IL-10 durch DZs und Tregs in der Lunge zur Induktion von Toleranz führt, was im Falle der Therapie als Erfolg zu werten ist. In Abbildung 4.4a ist ein signifikanter Unterschied zwischen der Positivkontrolle und der Negativkontrolle, im Vergleich zu der 'Responder' Therapiegruppe zu erkennen. Diese Tiere zeigten allerdings keinen Unterschied in der Ausschüttung von IL-13 (Abb. 4.4b) und $\text{IFN}\gamma$ (Abb. 4.4c) im Vergleich zu den Kontrolltieren. Die selben Resultate sind in der 'Nonresponder'-Therapiegruppe zu erkennen, mit dem Zusatz, dass

es in der IL-10 Sekretion auch keinen Unterschied zwischen den Kontroll- und den Therapie-Tieren gab.

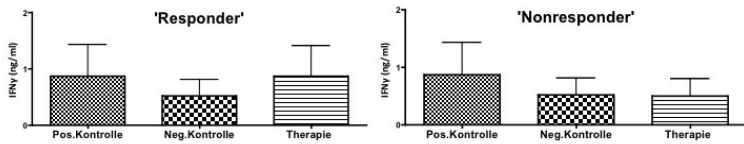
4. Ergebnisse



(a) IL-10 in der BAL



(b) IL-13 in der BAL



(c) IFN γ in der BAL

Abbildung 4.4 BAL Zytokine

Die Zytokine IL-10 (a), IL-13 (b) und IFN γ (c) wurden im Überstand der BAL im ELISA gemessen. Verglichen wurden die Positivkontrolle, mit Placebo-Pflaster und Asthma Induktion, die Negativkontrolle, mit Placebo-Pflaster und ohne Asthma Induktion und die Therapiegruppe mit Verum-Pflaster und Asthma Induktion. Unterschieden wurde dabei zwischen 'Responder' und 'Nonresponder' Tieren. Als 'Responder' wurden alle Mäuse gewertet, bei denen höheres IL-10 in der BAL gemessen wurde, als der Mittelwert der Positivkontrolle.

Dargestellt ist eine Zusammenfassung aus mehreren Versuchsansätzen mit dem gleichen Versuchsaufbau. Positivkontrolle n=14, Negativkontrolle n=14, 'Therapie-Responder' n=9, 'Therapie-Nonresponder' n=13; ** $p = 0.01$ bis 0.001 .

4.2.3 Zytokin-Bestimmung im Überstand der OVA-Peptid restimulierten LN-Zellen

Die immunologischen Vorgänge in der Lunge sind vor allem in den Lungen drainierenden LN zu erkennen. Die entnommenen LN mediastinale craniale und caudale wurden nach dem unter 3.3.4 beschriebenen Verfahren restimuliert. Die Resultate der gemessenen Zytokine aus den unstimulierten Überständen wurden von der detektierten Menge der allergenspezifisch Stimulation abgezogen. Die LN-Zellen der Tiere wurden innerhalb der jeweiligen Gruppe zusammengefasst und die zellfreien Überstände zur Bestimmung der Zytokine IL-10, IL-13 und IFN γ via ELISA verwendet. Im Gegensatz zu der Zytokinanalyse der BAL (Abschnitt 4.2.2) wurde nicht bei jedem Versuchsansatz die Zytokine der LN-Zellen bestimmt. Aus diesem Grund sind die in der Legende (Abb. 4.5) angegebene Anzahl der Versuchstiere geringer. Vergleichbar mit den Zytokin-Ergebnissen der BAL (Abb. 4.4) konnte auch bei den restimulierten LN-Zellen 'Responder' von 'Nonrespondern' unterschieden werden. Die 'Responder'-Therapiegruppe zeigte, wie in der Abbildung 4.5a zu sehen, eine nicht signifikante erhöhte Ausschüttung des Zytokins IL-10. Die IFN γ -Produktion ist in der Therapiegruppe bei den 'Nonresponder'-Tieren nicht zu detektieren und auch bei den 'Responder'-Tieren in einer nicht signifikant unterschiedlichen Konzentration im Vergleich zu den Kontrolltieren (Abb. 4.5c). Die Sekretion von IL-13 ist in der 'Responder'-Therapiegruppe im Vergleich zu der Positivkontrolle reduziert (Abb. 4.5b). Die Ergebnisse sind nicht signifikant.

4. Ergebnisse

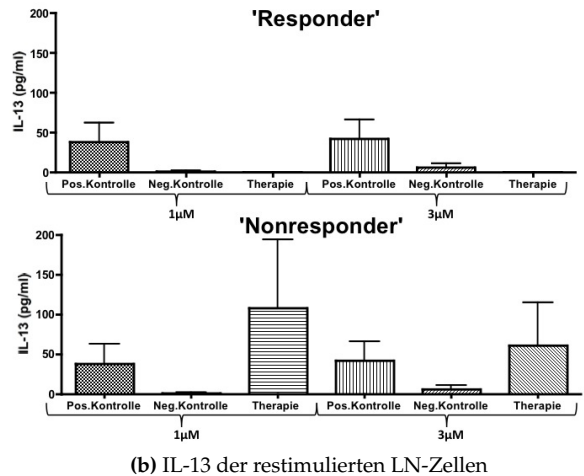
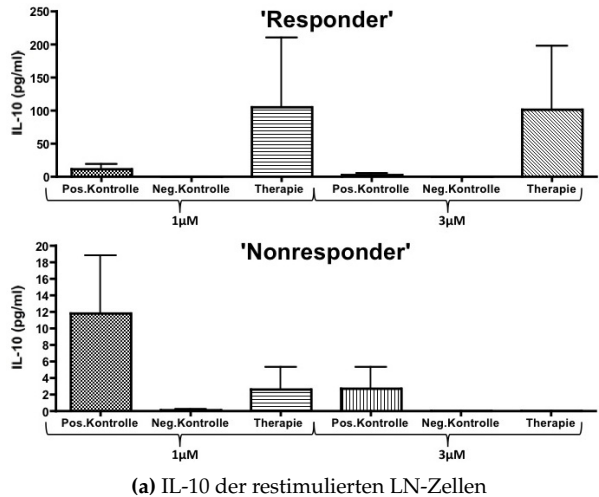


Abbildung 4.5 LN Zytokine

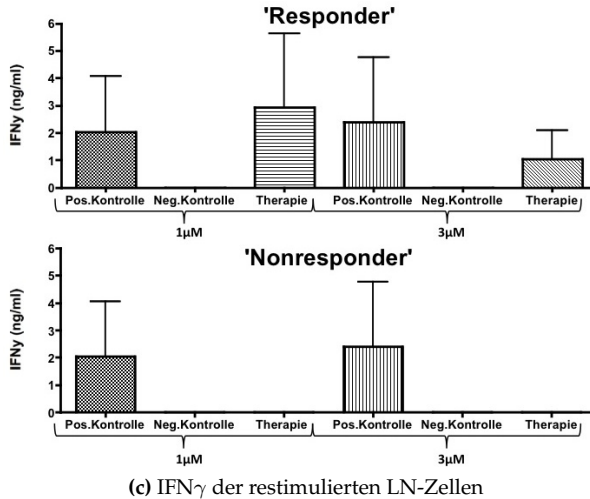


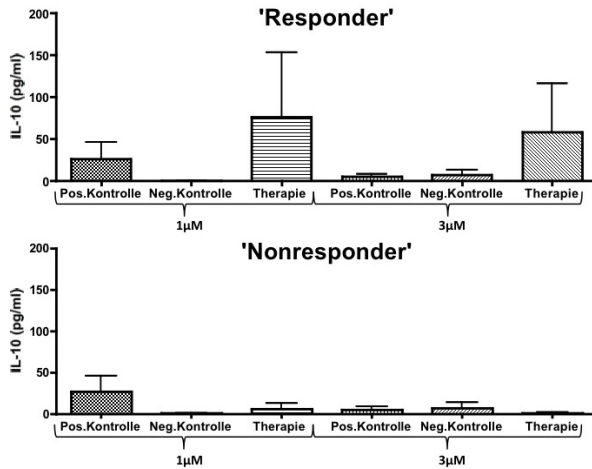
Abbildung 4.5 LN Zytokine

Die Lungen drainierenden LN-Zellen wurden nach der Entnahme, je nach Gruppenzugehörigkeit, zusammengefasst und mit den Konzentrationen 3 μ M, 1 μ M und 0 μ M OVA-Peptid (327-339) für 3 Tage bei 37°C restimuliert. Anschließend wurde der zellfreie Überstand entfernt und die Zytokine IL-10 (a), IL-13 (b) und IFN γ (c) im ELISA gemessen. Die Zytokinmenge, die ohne Restimulation des Peptids (0 μ M) detektiert wurde und als spontane Freisetzung zu werten war, wurde rechnerisch von den restimulierten Werten abgezogen. In den Abbildungen wurden die Positivkontrolle (Placebo-Pflaster, Asthma), die Negativkontrolle (Placebo-Pflaster, kein Asthma) und die Therapiegruppe (Verum-Pflaster, Asthma) miteinander verglichen. Unterschieden wurde dabei zusätzlich zwischen 'Responder' und 'Nonresponder' Tieren. Als 'Responder' wurden alle Mäuse gewertet, bei denen im restimulierten LN- und Milzzell-Überstand, im Vergleich zum Mittelwert der Positivkontrolle, erhöhtes IL-10 vorlag. Positivkontrolle n=8, Negativkontrolle n=8, 'Therapie-Responder' n=6, 'Therapie-Nonresponder' n=6

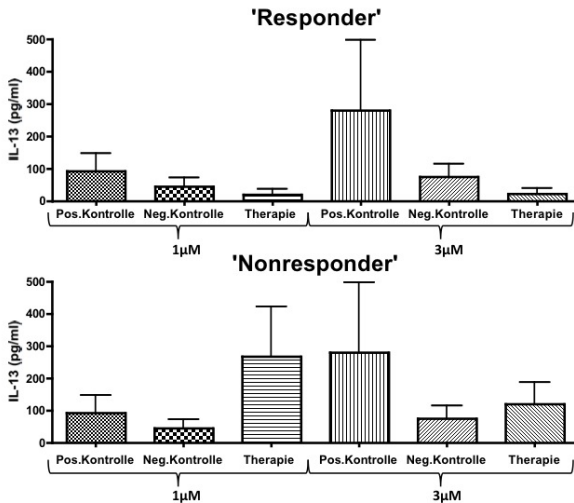
4.2.4 Zytokin-Bestimmung im Überstand der OVA-Peptid restimulierten Milzzellen

Zur Erkennung der systemischen immunologischen Vorgänge wurden die Milzen der Versuchstiere nach Gruppenzugehörigkeit zusammengefasst und wie unter 3.3.4 beschrieben analysiert. Im Anschluss wurden die Zytokine IL-10, IL-13 und IFN γ gemessen. Die Zytokinanalyse der Milzzellen wurde bei denselben Tieren durchgeführt, die auch in der Abb. 4.5 dargestellt sind.

In Anlehnung an der unter 4.2.2 und 4.2.3 dargestellten Vorgehensweise, wurde auch bei der Untersuchung der Zytokine des Milzzell-Überstandes zwischen 'Responder' und 'Nonrespondern' unterschieden. Die Ergebnisse sind unter 4.6 dargestellt. Wie schon bei den Zytokinen der LN-Zellen zu sehen war, ist im Vergleich zu der Positivkontrolle und der 'Nonresponder'-Darstellung, keine signifikante Änderung der Ausschüttung von IL-10 bei der 'Responder'-Therapiegruppe zu sehen (Abb. 4.6a). Die unter anderem von Th2 Zellen produzierte Menge an IL-13 ist in der Abbildung 4.6b zu sehen. IL-13 wird in der 3 μ M OVA-Peptid Restimulationskonzentration sowohl bei den 'Responder', als auch bei den 'Nonresponder' Therapietieren vermindert ausgeschüttet. Das gleiche gilt für die geringere OVA-Peptid-Konzentration, allerdings nur bei den 'Responder'-Mäusen. Die IFN γ Sekretion (Abb. 4.6c) zeigt in der 'Nonresponder'-Gruppe eine verstärkte Freisetzung dieses Interferons. Eine Immundeviation ist nicht zu erkennen.



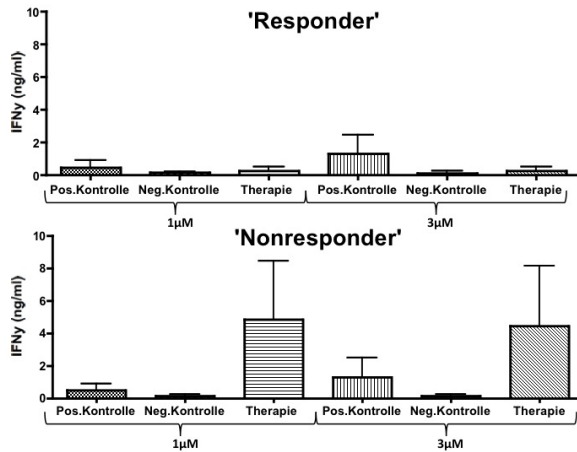
(a) IL-10 der restimulierten Milzzellen



(b) IL-13 der restimulierten Milzzellen

Abbildung 4.6 Milz Zytokine

4. Ergebnisse



(c) IFN γ der restimulierten Milzzellen

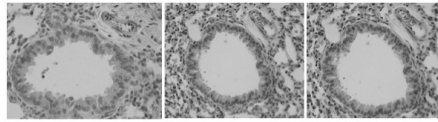
Abbildung 4.6 Milz Zytokine

Die Zytokine IL-10 (a), IL-13 (b) und IFN γ (c) wurden im Überstand der 3 μ M, 1 μ M und 0 μ M OVA-Peptid (327-339) restimulierten Milzzellen, via ELISA gemessen. Der zellfreie Überstand wurde nach einer Inkubation der Zellen mit dem Peptid über drei Tage bei 37°C gewonnen. Die Werte der 0 μ M Restimulation wurden rechnerisch abgezogen (spontane Zytokinfreisetzung), um die allergenspezifische Zytokinproduktion darstellen zu können. In der Abbildung wurden die Positivkontrolle (Placebo-Pflaster, Asthma), die Negativkontrolle (Placebo-Pflaster, kein Asthma) und die Therapiegruppe (Verum-Pflaster, Asthma) miteinander in Vergleich gesetzt. Zusätzlich wurde zwischen 'Responder' und 'Nonresponder' Tieren unterschieden. Als 'Responder' wurden alle Versuchstiere gewertet, bei denen höheres IL-10 im restimulierten LN- und Milzzell-Überstand gemessen wurde, als beim Mittelwert der Positivkontrolle. Positivkontrolle n=8, Negativkontrolle n=8, 'Therapie-Responder' n=6, 'Therapie-Nonresponder' n=6

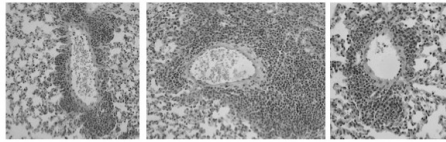
4.2.5 Histologie der Lunge

Neben den immunologischen Verfahren zur Bestimmung der Resultate der Toleranztherapie, gab auch die Analyse der Lungenschnitte einen Hinweis auf den Therapieverlauf. Die Lungen der Versuchstiere wurden, wie unter 4.2.5 beschrieben, zu histologischen Präparaten verarbeitet. In der Abbildung 4.7a sind die Bronchien gesunder Lungen von sog. Negativkontroll-Tieren zu erkennen. Dem zufolge sind die Lungen frei von Infiltraten. Im Gegensatz dazu sind die Lungenschnitte der Positivkontrolle zu sehen (Abb. 4.7b). Hier kann deutlich ein starkes peribronchiales und perivaskuläres Entzündungsinfiltrat identifiziert werden. Diese Mäuse wurden, wie die Negativkontrolltiere, mit einem Placebo-Pflaster behandelt, jedoch mit anschließender Induktion von Asthma. Die Lungenschnitte zeigen deutlich die Auswirkung des allergischen Asthmas.

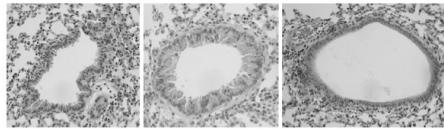
Vergleicht man die Lungenschnitte der beiden Kontrollgruppen mit den Präparaten der Therapiegruppen, kann festgestellt werden, dass es klare 'Responder' (4.7c) und 'Nonresponder' (4.7d) Tiere gegeben hat. Die sog. 'Responder' zeigen deutlich verminderte Zellinfiltrate und scheinen auf die Therapie angesprochen zu haben. Im Gegensatz dazu weisen die 'Nonresponder'-Präparate keinen Unterschied zur Positivkontrolle auf. Die Therapie hat nicht angeschlagen. Zur exakten Beurteilung, ob ein Therapietier ein 'Responder' war oder nicht, wurden die Infiltrate peribronchial und perivaskulär untersucht. Dabei wurden neun Therapiemäuse, mit jeweils zwei Lungenschnitten, aus insgesamt vier Versuchsansätzen beurteilt. Es ergab sich, dass drei der Tiere klare 'Nonresponder' waren, da der Großteil der Gefäße und Bronchien von Infiltraten umgeben waren. Anders verhielt es sich bei den sechs 'Responder'-Tieren. Hier waren die Bronchien zu großen Teilen frei von Infiltraten oder nur eine geringgradige Zellansammlung vorzufinden.



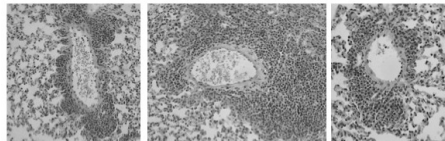
(a) Lungenschnitt Negativkontrolle



(b) Lungenschnitt Positivkontrolle



(c) Lungenschnitt 'Responder' Therapietiere



(d) Lungenschnitt 'Nonresponder' Therapietiere

Abbildung 4.7 Lungenschnitte

Die Lungen der Versuchstiere wurden einzeln in 4% Paraformaldehyd eingelegt, in Paraffin eingebettet, am Mikrotom in 4 μ m große Präparate zugeschnitten und HE gefärbt. (4.2.5). Zur Beurteilung wurden die Lungenschnitte unter dem Mikroskop betrachtet und fotografiert. Zu sehen sind die Lungenschnitte von Tieren aus der Negativkontrolle (Placebo-Pflaster, keine Asthma-Induktion), der Positivkontrolle (Placebo-Pflaster, Asthma-Induktion) und der Therapiegruppe (Verum-Pflaster, Asthma-Induktion) nach HE-Färbung. Bei den Therapietieren sind 'Responder', die auf die Therapie angesprochen haben und eine verminderte peribronchiale Zellinfiltration zeigen, von den 'Nonrespondern' zu unterscheiden. Positivkontrolle n=3, Negativkontrolle n=3, 'Therapie-Responder' n=6, 'Therapie-Nonresponder' n=3

4.3 Auswahl der Pferde

Im Sommer 2008 wurden die drei größten Islandpferde-Höfe im Umkreis von Würzburg aufgesucht. Da es bei dieser Rasse eine Häufung an Sommerekzem-Erkrankungen gibt, wurden speziell diese Aufzucht-Gestüte gewählt, die In-vitro-Diagnostik zu etablieren und die erste Therapiestudie durchzuführen. Die Bereitschaft an der Diagnostik-Entwicklung und der Studie zur Behandlung des Sommerekzems teilzunehmen, war sofort gegeben und eine Bestätigung unterschrieben. Somit konnten mehrere Pferde mit allergischen Symptomen unter gleichen Haltungsbedingungen miteinander verglichen werden.

In den Reitbetrieben wurde den Pferden beim ersten Besuch Blut für den Allergietest genommen und die Symptomstärke beurteilt. Grundlage dieser Klassifizierung war die unter 3.14 beschriebene Einteilung. Die Ergebnisse sind aus der Tabelle 4.1 zu entnehmen. Es wurde aber nicht nur Blut von Allergiker-Pferden genommen, sondern auch von je drei gesunden Islandpferden pro Hof. Diese Pferde sind am Ende der Tabelle 4.1, ab dem Tier Kso, zu sehen. Dieses Blut wurde zur Erhebung einer Negativkontrolle benötigt. Zur Fortsetzung und Erweiterung der In-vitro-Diagnostik und der epikutanen Toleranz-Therapie bei verschiedensten Pferderassen wurden im Sommer 2009 weitere Pferde unterschiedlicher Rasse, Geschlecht, Alter und Haltung neu mit in die Studie aufgenommen. Diese Pferde erhielten als Versuchsnummer die Zahlen 1-24 (Tabelle 4.2). Das Evaluationsverfahren entspricht dabei exakt dem, der Pferde aus Tabelle 4.1.

4. Ergebnisse

Pferd	Rasse	Alter	Geschlecht	Symptom-Klassifizierung
Kei	Isländer	17	Wallach	1
Ksa	Isländer	25	Hengst	3
Kku	Isländer	11	Wallach	1
Kfl	Isländer	17	Wallach	4
Kbl	Isländer	28	Wallach	1
Wau	Isländer	12	Stute	4
Wol	Isländer	25	Stute	3
Wgl	Isländer	12	Hengst	2
Wso	Isländer	14	Wallach	3
Wbj	Isländer	23	Wallach	4
Wto	Isländer	21	Wallach	4
Wba	Isländer	21	Stute	2
Wdo	Isländer	21	Wallach	3
Phe	Isländer	6	Stute	2
Pso	Isländer	19	Stute	2
Pgo	Isländer	23	Stute	4
Pju	Isländer	5	Hengst	1
Pra	Isländer	20	Stute	2
Kso	Isländer	17	Wallach	0
Kmj	Isländer	20	Wallach	0
Ksl	Isländer	22	Wallach	0
WF-F	Isländer	6	Wallach	0
Wel	Isländer	17	Wallach	0
WH-G	Isländer	20	Wallach	0
Pth	Isländer	8	Wallach	0
Phi	Isländer	15	Wallach	0
Pge	Isländer	15	Wallach	0

Tabelle 4.1 Pferde 1

Die vorgestellten Pferde wurden, wie unter 3.5 beschrieben, nach den 13. Punkten von DEEGEN und GLITZ (2002) allgemein und anschließend dermatologisch untersucht. Ergaben die Anamnese und die allgemeine Untersuchung keine besonderen Auffälligkeiten, außer den Symptomen der Allergie, wurden die Tiere in die Studie aufgenommen und mit einer Versuchsnummer (Buchstaben) versehen. Dabei waren alle Pferde mit einem K aus Kreuzwertheim, mit einem W aus Klingenberg a. M. und mit einem P aus Ansbach. Die weiteren Buchstaben sind Abkürzungen der Tiernamen. Ab dem Tier Kso sind die gesunden Tiere aufgelistet. Zudem ist die Klassifizierung der Symptomstärke (1=schwache, 4=starke Symptome) vom Sommer '08 zu 2009.

Pferd	Rasse	Alter	Geschlecht	Symptom-Klassifizierung
1	Isländer	13	Stute	2
2	bayer. Warmblut	22	Wallach	2
3	Mischling	6	Wallach	1
4	bayer. Warmblut	22	Stute	3-4
5	Haflinger	15	Wallach	3-4
6	Isländer	16	Wallach	2
7	Criollo	12	Wallach	3-4
8	Mischling	19	Stute	3
9	Mischling	15	Stute	4
10	Shetlandpony	8	Hengst	4
11	Shetlandpony	7	Stute	1
12	Shetlandpony	10	Stute	3
13	Isländer	22	Stute	4
14	Mischling	8	Stute	2
15	Paint	5	Stute	2
16	poln. Warmblut	14	Wallach	4
17	Irish Tinka	12	Wallach	1-2
18	Andalusier	12	Wallach	2
19	Friese	14	Stute	3
20	Friese	3	Stute	3
21	Friese	13	Wallach	1
22	Shetlandpony	9	Wallach	1
23	Shetlandpony	14	Wallach	3
24	Mischling	15	Stute	1

Tabelle 4.2 Pferde 2

Im Sommer 2009 wurden weitere Pferde unterschiedlicher Rasse, Alter, Geschlecht und Herkunft in die Studie mit aufgenommen. Lediglich die Pferde 4 und 5, 19 und 20, 23 und 24 standen im selben Stall. Die Pferde wurden, wie bereits bei Tabelle 4.1 erläutert, untersucht und unter denselben Bedingungen in die Studie aufgenommen. Die Pferde erhielten eine Versuchsnummer von 1-24 und wurden aufgrund ihrer Symptomstärke zwischen 1 (schwache Symptome) und 4 (starke Symptome) klassifiziert.

4.4 Allergenspezifische Allergiediagnose

Eine rein symptomatische Beurteilung der Allergie der Pferde schien im Zusammenhang mit der Durchführung einer allergenspezifischen Immuntherapie nicht ausreichend, da diverse Allergien gegen unterschiedliche Substanzen und Mücken sich in Form von Juckreiz äußern. Diese Allergene rufen damit sehr ähnliche und optisch nicht zu unterscheidende Symptome hervor, wie die Allergie gegen die *Culicoides* Mücke. Aus diesem Grund wurde die In-vitro-Diagnostik von KAUL (1998) herangezogen und spezifiziert. Das Blut wurde, wie unter 3.6.2 beschrieben, gewonnen und nach dem Protokoll von DIETZE (2009) aufgereinigt (3.6.3). Es wurden nur die granulozytären Zellen weiterverwendet (3.6.4). Das freigesetzte Histamin der granulozytären Zellen wurde anschließend vom Labor Diagnostika Nordhorn im 'Histamin Research ELISA' gemessen.

4.4.1 Physikalische und Spontane Histaminfreisetzung

Zur Erfassung der grundsätzlichen Histamin-Menge in den granulozytären Blutzellen wurde zum einen die spontane Histamin-Freisetzung (HS) bestimmt, in dem die Blutzellen ohne Stimulation, wie unter 3.6.4 verarbeitet wurden. Zum anderen wurde die maximale Histaminkonzentration (HP) der granulozytären Zellen ermittelt, in dem die Zellen durch Kochen denaturiert wurden und somit das gesamte Histamin detektiert werden konnte (siehe 3.6.4). Bei der Betrachtung dieser Histaminwerte (Abb. 4.8) zeigt sich weder bei der HP noch bei der HS ein signifikanter Unterschied zwischen den Allergikern und den gesunden Pferden. Somit ist dargestellt, dass die Histaminkonzentration im Blut dieser beiden Gruppen sich

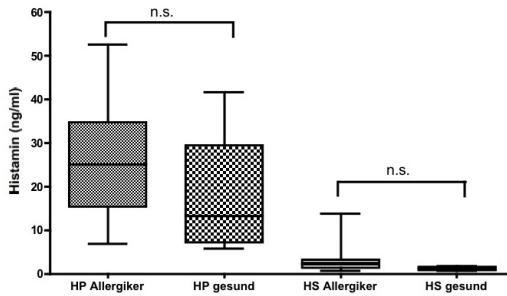


Abbildung 4.8 Spontane und Physikalische Histaminfreisetzung

Die granulozytären Zellen von Allergikern und klinisch gesunden Pferden wurden während der Expositionsphase im Sommer gewonnen und auf ihre HS und HP untersucht. Die HS ist die Menge an Histamin, die von den Zellen ohne Stimulation freigesetzt wird. Die HP zeigt die maximale Histaminmenge der granulozytären Zellen, die durch Denaturierung der Zellen (kochen) detektiert werden kann. Die dargestellten Resultate waren von Isländer von drei verschiedenen Reitställen. Das Blut wurde in den Sommermonaten während der Expositionsphase gewonnen. Allergiker n=24, Gesund n=8, n.s. = nicht signifikant

nur geringfügig unterscheidet, wenn kein Kontakt zum Allergen bestand.

4.4.2 Allergenspezifische Allergiediagnostik-Sommer

Zur Differenzierung zwischen den gesunden Pferden, denen, die auf die *Culicoides*-Mücke allergisch reagieren (Sommerekzem) und denen Allergikern, die den Sommerekzemen symptomatisch ähnlich sind, wurde in den Sommermonaten 2008 und 2009 Blut von allergischen und gesunden Pferden gewonnen. Die allergischen Pferde zeigten zu dieser Zeit die typischen Symptome. Dabei konnte visuell nicht zwischen den *Culicoides*-Allergikern und den Nicht-*Culicoides*-Allergikern unterschieden werden. Dazu war der Bluttest nötig. Das Blut wurde wie beschrieben verarbeitet (3.6.3, 3.6.4) und der Gehalt des spezifisch freigesetzten Histamins bestimmt. Anschließend wurden die Ergebnisse der gesunden Tiere mit denen der klinischen Allergikern verglichen. In Abbildung 4.9 wird deutlich, dass bei Sommerekzemen, im Vergleich zu den anderen Allergikern oder gesunden Pferden, durch dieses Diagnoseverfahren mehr allergenspezifisches Histamin detektiert werden kann. Dieser Test kann damit zur Unterscheidung von Sommerekzemen, Allergikern und gesunden Pferden verwendet werden.

4.4.3 Allergenspezifische Allergiediagnostik-Winter

Derselbe Test, der granulozytären Zell-Stimulation mit dem *Culicoides*-Protein (vgl. 4.4.2) wurde darüber hinaus auch zu verschiedenen Zeitpunkten im Winter durchgeführt. Zu dieser Zeit waren alle Pferde ohne allergische Symptome. Ein Unterschied ist zwischen Sommerekzemen, den Nicht-*Culicoides*-Allergikern und den gesunden Tieren (Abb. 4.10) zu erkennen. Im Winter ist bei den Sommerekzemen, im Gegensatz zu den anderen Pferden, eine höhere

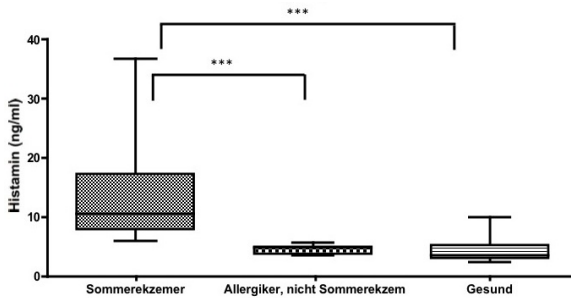


Abbildung 4.9 Allergenspezifische Histaminfreisetzung in den Expositionsmonaten

Den an der Studie teilnehmenden Pferden wurde während der Expositionszeit Blut aus der Vena jugularis genommen. Die aus dem Vollblut erhaltenen granulozytären Zellen wurden mit dem Allergen, dem *Culicoides*-Protein, stimuliert und die dadurch freiwerdende Histaminmenge im 'Histamin Research ELISA' bestimmt.

Sommerkezkemer n=33, Nicht-Sommerkezkemer n=9, Gesund n=8; *** $p < 0,001$.

allergenspezifische Histaminmenge zu messen. Insgesamt sind die Werte deutlich niedriger, verglichen mit den Resultaten im Sommer (Abb. 4.9). Eine gesicherte Aussage über den Allergiestatus eines Pferdes durch diesen Test ist diesen Erkenntnissen zu Folge, nur in den Sommermonaten zu empfehlen.

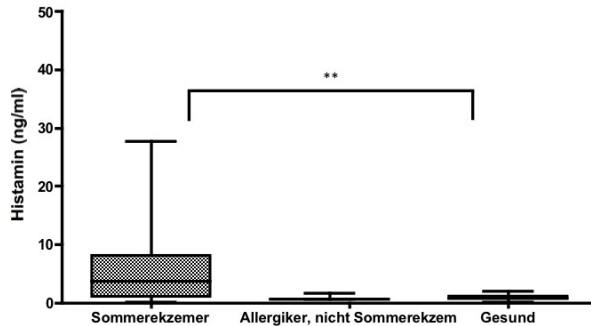


Abbildung 4.10 Allergenspezifische Histaminfreisetzung Winter

Die granulozytären Zellen aus dem Vollblut von Sommerekzemern, Nicht-Sommerekzemern und klinisch gesunden Pferden wurden während der symptomfreien Zeit im Winter gewonnen und mit dem *Culicoides*-Protein restimuliert. Die frei gewordenen Histaminmenge wurde im 'Histamin research ELISA' detektiert.

Sommerekzemer n=24, Nicht-Sommerekzemer n=3, Gesund n=9; ** $p = 0.01$ zu 0,001.

4.5 EPIT beim Sommerekzem des Pferdes

Für die Durchführung der EPIT war der Allergietest Voraussetzung, denn die Therapie sollte nur ein Allergen, den Ganzkörperextrakt der *Culicoides*-Mücke, beinhalten. Somit sollten nur Tiere an der Studie teilnehmen, die positiv auf die Mücke reagierten. Da der Allergietest im Sommer 2008 noch nicht etabliert war, wurden die Pferde aus Tabelle 4.1 im besagtem Jahr ausschließlich nach den saisonalen Allergiesymptomen beurteilt und im Winter 2009 behandelt. Die In-vitro-Diagnose wurde bei diesen Pferden im Sommer 2009, gemeinsam mit der Diagnose der Pferde aus Tabelle 4.2, durchgeführt. Dabei mussten drei Pferde, die sich als *Culicoides* negativ herausstellten, aus der Studie von 2008 ausgeschlossen werden. Dabei handelte es sich um zwei Verum behandelte Pferde und ein Tier, das Placebo verabreicht bekam.

Im Anschluss an die Diagnostik folgte die Ergebnisevaluierung nach dem im Kapitel 4.4.2 beschriebenen Verfahren. Die *Culicoides* positiven Pferde wurden daraufhin in zwei Gruppen aufgeteilt: eine Placebo-Gruppe und eine Verum-Gruppe. Dabei wurde darauf geachtet, dass sich in jeder Gruppe möglichst gleich viele Pferde mit vergleichbarer Symptomstärke befanden. Bei den Pferden aus Tabelle 4.2, die auf einem Hof standen, wurde zudem berücksichtigt, dass jeweils ein Tier mit Placebo und eines mit Verum behandelt wurde. Die Behandlung der Pferde fand jeweils in den Monaten Januar-April statt. Während in der Studie 1 noch acht Wochen lang die Pflastertherapie angewandt werden konnte, war dies auf Grund der größeren Anzahl der Pferde in Studie 2 und 3 nicht mehr möglich. Somit erhielten die Pferde nur noch sechs Wochen lang die Pflaster Applikation. Zudem zeigte sich in Studie 1, dass die Konzentration von 0,01mg die geringste positive Reaktion bei der Betrachtung der Histaminwerte der Verum behandelten Tieren hervorgerufen hat. Folglich wurde die Konzentration im Jahr 2010 nicht mehr angewandt. Stattdessen wurde versucht durch Veränderung der Zusammensetzung der Basiscreme die Penetration des *Culicoides*-Protein durch die Haut zu fördern. Aus diesem Grund sind drei verschiedene Studien bzw. Studienabschnitte zu unterscheiden (Tabelle 4.3).

Die Cremes wurden einen Tag vor der Applikation, wie unter 3.2.10 dargestellt, angerührt und in einer Kühlbox zu den Pferden transportiert. Dort erfolgte zu Beginn der Therapie eine allgemeine Untersuchung der Tiere und eine spezielle Untersuchung der Haut. Waren keine Auffälligkeiten bemerkt worden, wurde die Creme unter einem Pflaster appliziert (siehe 3.7.2). Wöchentlich wurde die allgemeine und spezielle Untersuchung wiederholt und ein neues Pflaster geklebt. In Abbildung 4.11 ist zu sehen, wie das Pflaster am Tag der Applikation (1) und nach einer Woche (2) aussah. Außerdem ist die Applikationsstelle nach Entfernen des Pflasters abgebildet (3). Es wird deutlich, dass es zu keinen Hautreizungen oder anderen Irritationen der Haut gekommen war. Das Allgemeinbefinden der

4. Ergebnisse

Tabelle 4.3 Epikutane Toleranztherapie beim Pferd - Studienansätze

Studie	Erläuterung
1	1. Behandlungszyklus der Islandpferde aus drei verschiedenen Reiterhöfen im Jahr 2009. Die Allergenkonzentration betrug 0,1mg, 0,05mg oder 0,01mg. Die Creme war zu 90% aus DAC Basiscreme und zu 10% aus Vaseline. Das Pflaster wurde 8x gewechselt.
2	2. Behandlungszyklus der Therapie der Islandpferde im Jahr 2010. Die Allergenkonzentration betrug 0,1mg oder 0,05mg. Die Creme war reine Vaseline oder bestand aus gleichen Teilen Vaseline und DAC Basiscreme. Das Pflaster wurde 6x gewechselt.
3	Behandlung weiterer Pferde, verschiedener Rasse im Jahr 2010. Die Allergenkonzentration betrug 0,1mg oder 0,05mg. Die Creme war reine Vaseline oder bestand aus gleichen Teilen Vaseline und DAC Basiscreme. Das Pflaster wurde 6x gewechselt.

Pferde war stets ohne besonderen Befund. Sowohl im Jahr 2009, als auch im Jahr 2010 gab es keine Zwischenfälle im Bezug auf das Therapeutikum.



Abbildung 4.11 Epikutane Pflaster-Therapie am Pferd

In der Abbildung ist das frisch applizierte (1) und das eine Woche getragene Pflaster (2) und das Bein nach Entfernung des Pflasters (3) zu sehen. (1) Das Pflaster wurde nach Rasur und Reinigung der kranialen Fläche des Röhrbeins über die Allergen- bzw. Placebocreme-Mischung angebracht (auf dem Bild als weiße Fläche zu sehen) und im wöchentlichen Rhythmus gewechselt. (2) Das Pflaster hat eine Woche am Pferdebein gehalten. Es kam zu keinem Juckreiz oder anderweitiger Zerstörung des Pflasters. (3) Das Pflaster kann durch manuelles Weiten ohne Schmerzen vom Pferdebein gezogen werden. Der Schmutz blieb dabei außerhalb der Pflasterfläche.

Der Erfolg der durchgeführten EPIT wurde an zwei verschiedenen Parametern gemessen. Die allergenspezifischen Histaminwerte wurden vor der Therapie und im Sommer nach der Therapie bestimmt und mit den Werten der Placebo-behandelten-Gruppe verglichen. Der HP wurde dabei mit 100% angesetzt und der prozentuale Anteil der allergenspezifischen Histaminkonzentration bestimmt. Des weiteren wurde eine Symptomklassifizierung, nach dem beschriebenen Schema (3.14), im Sommer vor der Therapie durchgeführt und diese im Sommer nach der Therapie wiederholt. Diese Werte wurden ebenfalls verglichen. Genauere Angaben folgen in der detaillierten Betrachtung der Studien.

4.5.1 Studie 1, Island-Pferde, Jahr 1

Zu Beginn dieser Studie wurden im Sommer 2008 Tiere aus drei verschiedenen Islandpferd-Reiterhöfen im Bezug auf ihre Allergiesymptome untersucht. Dabei wurden die Pferde zunächst nur rein optisch und auf Grund der Vorgeschichte (saisonale, allergische Symptome) als Sommerexzemer eingestuft. Es folgte eine Klassifizierung der Symptome und anschließend eine Einteilung in die verschiedenen Behandlungsgruppen.

Die Gruppen unterschieden sich in der Allergenkonzentration (C.-Protein) und der Einteilung in Placebo- und Verum-Behandlung. Es wurde pro Hof eine andere Konzentration des Allergens im Therapeutikum gewählt und versucht eine gleichmäßige Anzahl an Placebo- und Verumbearbeiteten-Pferden zu erhalten. Die folgenden Allergenkonzentrationen wurden getestet:

- Hof in Kreutzwertheim: 0,01mg C.-Protein
- Hof in Ansbach: 0,05mg C.-Protein
- Hof in Klingenberg am Main: 0,1mg C.-Protein

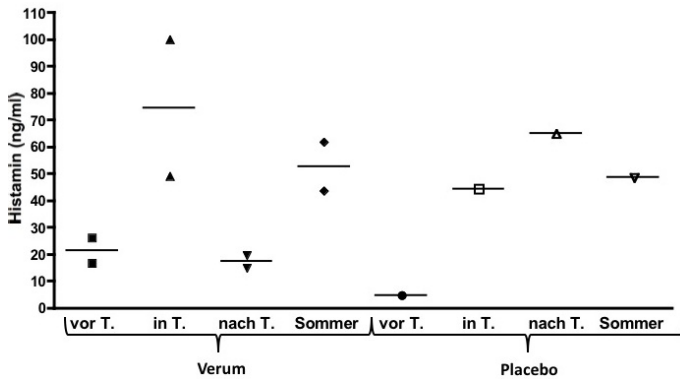
Die Basiscreme, in die das Allergen eingemischt wurde, war bei allen Tieren gleich zusammengesetzt und bestand aus 90% DAC Basiscreme und 10% Vaseline.

Im Januar 2009 wurde die EPIT das erste Mal durchgeführt. Das Pflaster konnte stets nach einer Rasur der Applikationsstelle, am rechte Hinterbein angebracht werden und hat sich in vereinzelt Fällen nach 5-6 Tagen abgelöst. Nach insgesamt neun Wochen und achtmaligem Pflasterwechsel konnte als Resümee eine ohne Nebenwirkungen stattgefundene Allergietherapie verzeichnet werden. Während diesen neun Wochen wurde dreimalig Blut zur Histaminbestimmung gewonnen: vor der Therapie (vor T.), nach vier

Wochen (in T.) und zum Ende der Therapie nach neun Wochen (nach T). Zusätzlich erfolgte eine Histamin-Messung im Sommer 2009. Diese Histaminwerte wurden zueinander in Vergleich gesetzt und in Abbildung 4.14 dargestellt. Die Histaminwerte der Pferde, bei denen nicht an allen Terminen Blut gewonnen werden konnte, wurden nicht mit in die Ergebnisse der Abbildung 4.14 einbezogen. Zudem wurde die Symptomklassifizierung vom Jahr 2008 im Sommer 2009 wiederholt und die Ergebnisse nebeneinander aufgestellt (Abb. 4.13).

Am Hof in Kreutzwertheim (Abb. 4.12a) ist zu sehen, dass es während der Therapie vor allem bei der Verumgruppe zu einer Steigerung des spezifischen Histamins im Vergleich zu dem Zeitpunkt vor der Therapie gekommen war. Dies deutet darauf hin, dass das Allergen durch die Haut diffundiert und es zu einer Erkennung durch das Immunsystem gekommen war. Diese Erkennung scheint am Ende der Therapie durch Toleranzmechanismen unterdrückt worden zu sein. Die Aussage wird durch den Vergleich der Ergebnisse der Verumgruppe mit denen der Placebogruppe bestärkt: Nach der Therapie steigt der spezifische Histaminwert der Placebotiere im Gegensatz zu dem Wert der Verumgruppe. Im Sommer sind die Werte des spezifischen Histamins nahezu gleich und kein Therapieerfolg zu verzeichnen. Dies bestätigt auch die Symptomklassifizierung in Abbildung 4.13a, bei dem kein Unterschied der Symptomstärke vom Jahr 2008 zum Jahr 2009 zu erkennen ist. Sowohl die Placebotiere, als auch die Verumtiere blieben auf dem selben Level, wie im Vorjahr. Die Konzentration von 0,05mg wurde am Reitstall in Ansbach eingesetzt. Wie in Abb. 4.12b zu sehen, kam es im Winter zu keiner Veränderung der Histaminwerte. Lediglich während der Therapie sinkt die Konzentration des allergenspezifischen Histamins in der Placebogruppe, steigt aber erneut bis zum Ende der Therapie. Positiv fällt auf, dass es im Sommer in der Verumgruppe zu keiner Veränderung des Histaminwertes kommt, der Wert in der Placebogruppe jedoch steigt und somit ein Ansprechen auf die Therapie vermutet werden kann. Dies kann bei der Symptomklassifizierung (Abb. 4.13b) nicht bestätigt werden. Es kommt bei beiden Gruppen im Jahresvergleich

4. Ergebnisse

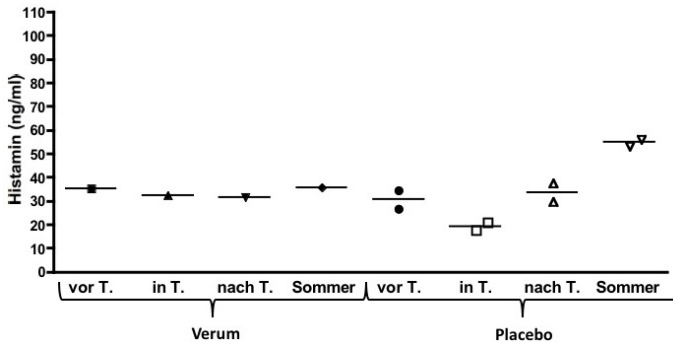


(a) Histaminmessung in Kreuzwertheim mit 0,01mg C.-Protein, Verumtiere n=2, Placebotiere n=1

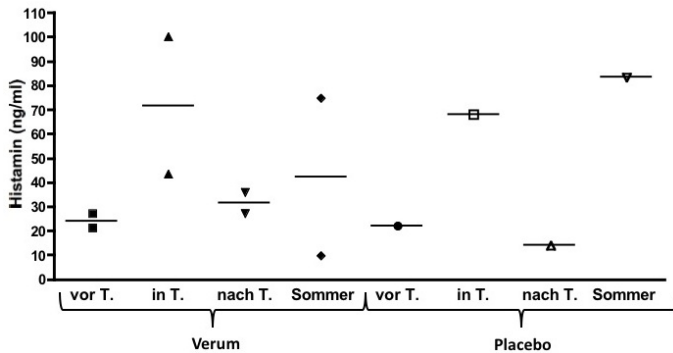
Abbildung 4.12 Histaminwerte Studie 1, Therapieverlauf 2009

zu einer Minimierung der Symptome, ohne Unterschied zwischen Placebo und Verum.

Ähnliche Resultate wie bei Abb. 4.12a sind am Reitstall in Klingenberg am Main, mit einer Konzentration von 0,1mg im Winter zu erkennen (Abb. 4.12c). Während der Therapie steigt der spezifische Histaminwert sowohl bei der Placebo-, als auch bei der Verumbehandlung und fällt diesmal aber bei beiden Gruppen erneut zum Zeitpunkt nach der Therapie. Im Sommer kommt es zu einer Minimierung des Histaminwertes in der Verumgruppe. Auch diese Ergebnisse sind in der Symptomklassifizierung nicht wieder zu erkennen (Abb. 4.13). Fasst man diese Resultate zusammen, ist der höchste positive Effekt bei den Konzentrationen 0,05mg und 0,1mg im Sommer zu erkennen. Aus diesem Grund wurden diese Konzentration bei Studie 2 erneut eingesetzt.



(b) Histaminmessung in Ansbach mit 0,05mg C.-Protein, Verumtiere n=1, Placebotiere n=2



(c) Histaminmessung in Klingenberg am Main mit 0,1mg C.-Protein, Verumtiere n=2, Placebotiere n=1

Abbildung 4.12 Histaminwerte Studie 1, Therapieverlauf 2009

Von Januar bis März 2009 wurde die erste Allergitherapiestudie durchgeführt. Es wurden dabei nur Islandpferde behandelt. Die Studie fand in drei verschiedenen Reitställen statt. In jedem Stall wurde eine andere Konzentration des Allergens in das Therapeutikum eingemischt (0,01mg, 0,05mg, 0,1mg). Außerdem gab es auf jeden Hof Tiere, die nur Verum oder nur Placebo bekamen. Die Therapie wurde über 9 Wochen durchgeführt und während dieser Zeit wurde dreimal Blut genommen. Die Zeitpunkte sind wie folgt beschriftet: vor der Therapie (Januar): vor T., nach vier Wochen Therapie: in T. und nach der Therapie (März): nach T.. Dazu ist die Histamin-Bestimmung vom Sommer 2009 dargestellt. In der Darstellung ist die prozentuale Bestimmung des allergenspezifischen Histamins zusehen. Als 100% wurde die maximal Histaminfreisetzung gewertet.

4. Ergebnisse

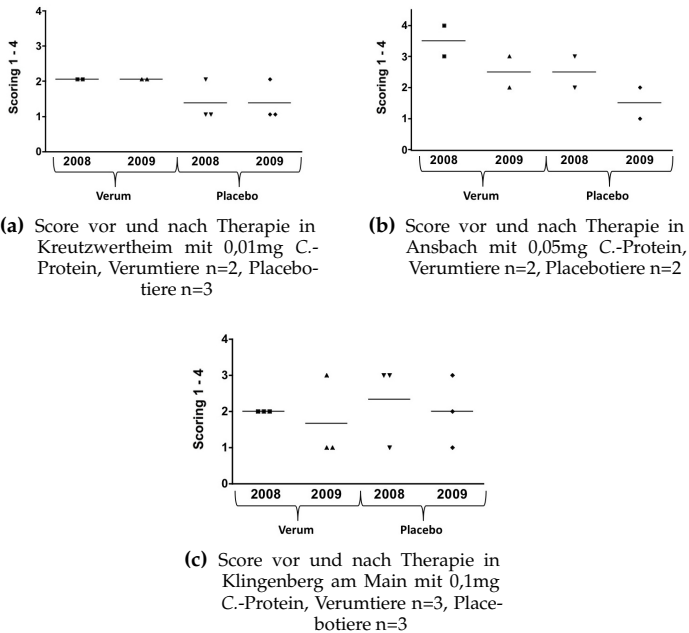


Abbildung 4.13 Klassifizierung Studie 1, Therapieverlauf 2008-2009

Die Tiere aus Studie 1 wurden sowohl im Sommer 2008, als auch im Sommer 2009 auf Grund ihrer Allergiesymptome in einer Skala von 1-4 klassifiziert (1= schwache, 4= schwere Symptome). Unterschieden werden hierbei die Resultate der Verum- und der Placebogruppe. Darüber hinaus werden die einzelnen angewandten Allergenkonzentrationen getrennt voneinander abgebildet. Unter (a) ist die Konzentration 0,01mg unter (b) 0,05mg und unter (c) 0,1mg zu sehen.

4.5.2 Studie 2, Island-Pferde, Jahr 2

Die Studie 2 konnte Dank der Zustimmung der Reitstallbesitzer erneut bei den Pferden der Isländer-Höfe durchgeführt werden. Es mussten dabei drei Tiere ausgeschlossen werden (zwei Verum und ein Placebo behandeltes Tier), da diese Pferde laut dem im Sommer 2009 durchgeführten Allergietest, nicht allergisch auf C. waren.

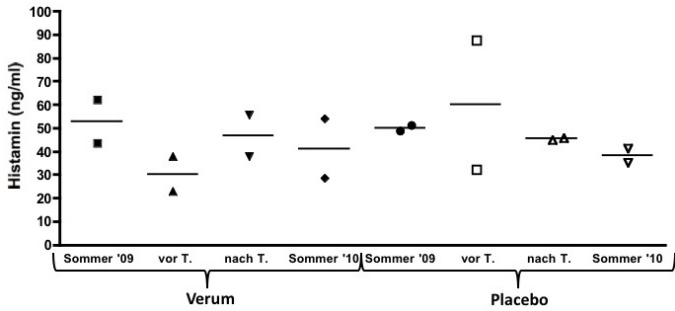
Die Prozedur der Creme- und Pflasterapplikation wurde wie bereits in Studie 1 beschrieben, beibehalten. Die Therapie dauerte dieses Mal 6 Wochen und es wurde nur zweimalig (am Anfang und am Ende) Blut genommen. In Anlehnung an Studie 1 wurden nur Pferde in die Histaminauswertung miteinbezogen, bei denen an allen Terminen Blut gewonnen werden konnte.

Eine Änderung ergab sich auch in der Allergenkonzentration und der Creme-Zusammensetzung. Aufgrund der Ergebnisse vom Vorjahr wurde das C.-Protein in einer Konzentration von 0,05mg und 0,1mg Allergen getestet. Die Creme wurde zum einen als reine Vaseline verwendet, zum anderen als Vaseline und DAC Basiscreme im Verhältnis 50:50. Diese Änderung der Creme basierte auf der Studie von SENTI et al. (2009a). Sie haben erfolgreich gezeigt, dass eine EPIT beim Menschen mit reiner Vaseline durchgeführt werden kann. Die Zusammensetzung aus 50% Vaseline und 50% DAC Basiscreme erschien allerdings hautverträglicher und wurde aus diesem Grund zum Vergleich angesetzt. Im Einzelnen sah die Gruppeneinteilung folgendermaßen aus:

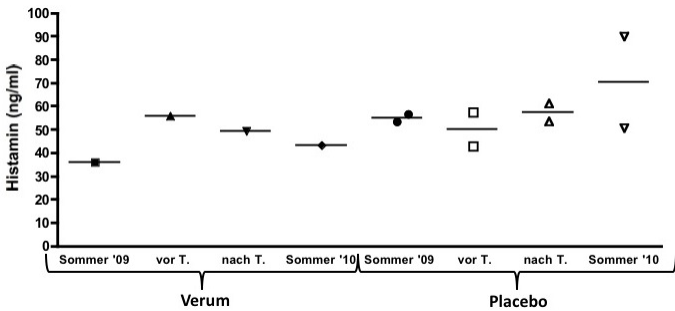
- Hof in Kreutzwertheim: 0,05mg C.-Protein, reine Vaseline
- Hof in Ansbach: 0,05mg C.-Protein, Vaseline:DAC 50:50
- Hof in Klingenberg am Main: 0,1mg C.-Protein, reine Vaseline

Im Bezug auf die Einteilung der Verum- oder Placebobehandlung gab es zur Studie 1 keine Änderung. Jedoch bekamen die Pferde aus Kreutzwertheim, im Vergleich zur 1. Studie, eine höhere Konzentration an C.-Protein (0,01mg Studie 1). Dies führte, wie in Abbildung 4.14a zu sehen, zu keiner Änderung der allergenspezifischen Histaminkonzentration. Nach der Therapie steigt die Histaminkonzentration in der Verumgruppe, bleibt aber unter dem Niveau vom Sommer 2009. Im Sommer 2010 ist der Histaminwert im Vergleich zum Vorjahr geringfügig vermindert. In der Placebogruppe sank ebenfalls der Histaminwert im Sommer 2010 verglichen mit dem Wert von Sommer 2009. Im Gegensatz dazu stehen die Klassifizierungswerte (Abb. 4.15a). Hier bleibt die Symptomstärke der Verum behandelten Pferde über alle drei Jahre gleich, steigt aber in der Placebogruppe. Betrachtet man den nächsten Versuchsansatz, der bei den Pferden in Ansbach mit gleichbleibender C.-Proteinkonzentration durchgeführt wurde, ist festzustellen, dass es wie in Studie 1 kaum Veränderungen in der Histaminkonzentration gegeben hat (Abb. 4.14b). Einen Hinweis auf einen Erfolg könnte der im Sommer 2010 gestiegene Histaminwert in der Placebogruppe sein. Im Gegensatz dazu blieb der Wert bei den Verumtieren konstant. Aber auch in diesem Fall spiegelt sich das Ergebnis nicht in der Klassifizierung wieder, die in Abbildung 4.15b zu sehen ist. Unabhängig ob mit oder ohne Wirkstoff behandelt wurde, waren die Symptome im Jahr 2010 schwächer als im ersten Jahr 2008.

Am Hof in Klingenberg am Main erhielten die Pferde im Jahr 2010 dieselbe Allergenkonzentration, wie im Jahr zuvor. Unabhängig, ob mit oder ohne Wirkstoff behandelt wurde stieg die Histaminkonzentration dieser Tiere nach der Therapie. Vergleicht man anschließend die Sommer-Histamin-Resultate ist zu sehen, dass keine Änderung statt gefunden hat (Abb. 4.14c). Dies spiegelt sich nicht in den Symptomen wieder, wie in Abbildung 4.15c zu sehen ist. Im Jahr 2010 wurden die Symptome, unabhängig der Behandlung, im Vergleich zu den Vorjahren schlimmer.



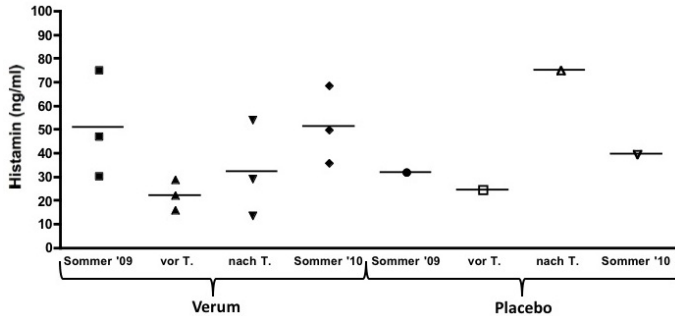
(a) Histaminmessungen in Kreutzwertheim mit 0,05mg C.-Protein, Vaseline als Creme, Verumtiere n=2, Placebotiere n=2



(b) Histaminmessung in Ansbach mit C.-0,05mg Protein, DAC/Vaseline als Creme, Verumtiere n=1, Placebotiere n=2

Abbildung 4.14 Histaminwerte Studie 2, Therapieverlauf 2010

4. Ergebnisse



(c) Histaminmessung in Klingenberg am Main mit C.-0,1mg Protein, Vaseline als Creme, Verumtiere n=3, Placebotiere n=1

Abbildung 4.14 Histaminwerte Studie 2, Therapieverlauf 2010

Der zweite Ansatz der Allergitherapiestudie wurde über sechs Wochen von Januar bis März 2010 durchgeführt. Es wurden die Islandpferde aus Studie 1 behandelt, mit Ausnahme der Tiere, die im Sommer 2009 im Allergietest ein negatives Testergebnis hatten und somit als nicht allergisch gegen die *Culicoides*-Mücke galten. Pro Stall wurde eine andere Placebo-/Allergencreme-Mischung angesetzt. Dies war im Stall in Kreutzwörtheim 0,05mg Allergen in reiner Vaseline (a), in Ansbach 0,05mg Allergen in einer DAC Basiscreme-Vaseline Mischung (50/50) (b) und in Klingenberg am Main 0,1mg Allergen in reiner Vaseline (c). Die Einteilung der Placebo- und Verumtiere wurde aus Studie 1 beibehalten. Im Januar vor (vor T.) und im März nach der Therapiedurchführung (nach T.) wurde Blut für die Histaminanalyse genommen und diese Werte mit den Ergebnissen vom Sommer 2009 (Sommer '09) und Sommer 2010 (Sommer '10) verglichen. In der Darstellung ist die prozentuale Bestimmung des allergenspezifischen Histamins zu sehen. Als 100% wurde die maximale Histaminfreisetzung gewertet.

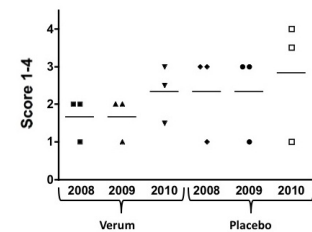
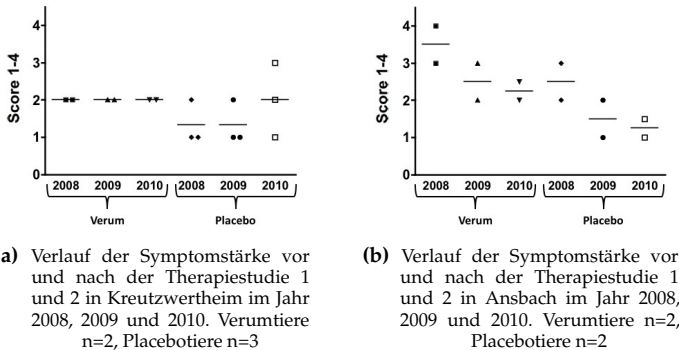


Abbildung 4.15 Klassifizierung Studie 2, Therapieverlauf 2008-2010

Dargestellt ist die Zusammenfassung der Klassifizierung aus Studie 1 und 2, um den Verlauf der Therapie erkennen zu können. Aus der Studie 1 mussten drei Tiere auf Grund des nachgereichten Allergietest genommen werden, da sie sich als nicht C. allergisch herausgestellt haben. Somit fehlt aus Ansbach ein Tier in der Placebogruppe und zwei Tiere aus Klingenberg am Main, (1 x Placebo, 2 x Verum).

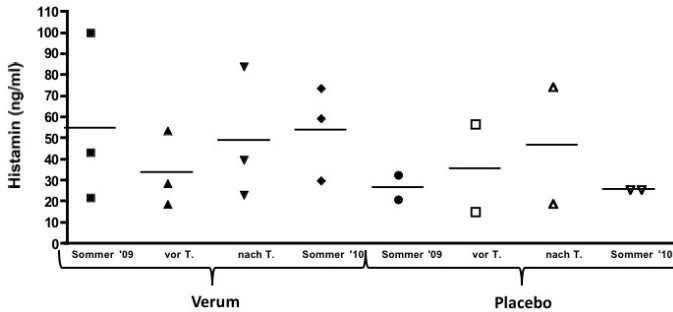
Für die Studie 2 wurden im Sommer 2010 die Symptome der Tiere, vergleichbar mit den Vorjahren 2008 und 2009, klassifiziert. Unterschieden wurden hierbei die Resultate der Verum- und der Placebogruppe. Lediglich am Hof in Kreuzwertheim wurde die Allergenkonzentration erhöht. Die Crememischung wurde, wie unter den einzelnen Bildern erläutert, verändert.

4.5.3 Studie 3, weitere Pferde, Jahr 1

Im Sommer 2009 wurden weitere Pferde mit Sommerekzem in die Studie aufgenommen. Diese Tiere wurden im In-vitro-Verfahren auf die Allergie gegen die *Culicoides*-Mücke getestet und nur die positiven Tiere in die Studie eingeschlossen. Gleichzeitig fand eine Symptomklassifizierung statt. Der Aufbau der Studie 3 entspricht exakt dem der Studie 2. Die Pferde wurden in drei Gruppen eingeteilt und innerhalb dieser Gruppen gab es Verum und Placebo behandelte Tiere. Die Einteilung war folgende:

- Gruppe A: 0,05mg C.-Protein, Vaseline:DAC 50:50
- Gruppe B: 0,05mg C.-Protein, reine Vaseline
- Gruppe C: 0,1mg C.-Protein, Vaseline:DAC 50:50

Bei der Betrachtung der allergenspezifischen Histaminwerte in Abbildung 4.16 wird deutlich, dass es in keiner der drei Gruppen zu einer Veränderung gekommen war, vergleicht man die Werte vom Sommer 2009 mit denen vom Sommer 2010. Bei Gruppe A (Abb. 4.16a) steigt der Histaminwert in der Placebogruppe nach der Therapie und kann aber im Sommer 2010 erneut auf den Wert des Vorjahres detektiert werden. Dies entspricht den Klassifizierungswerten aus der Abbildung 4.17a. Hier kommt es nur in der Placebogruppe zu einer geringfügigen Symptomminderung. Betrachtet man im Folgenden die Histamin- und Klassifizierungswerte der Gruppe B (Abb. 4.16b, 4.17b), ist zu sehen, dass sowohl in der Verum-, als auch in der Placebogruppe die Symptome minimiert werden. Die Histaminkonzentration im Sommerjahresvergleich bleiben wieder unverändert. In der Placebogruppe der Gruppe C steigt der Histaminwert im Sommer 2010 stärker, verglichen mit dem Vorjahr und der Verumgruppe (Abb. 4.16c). Allerdings handelt es sich hier nur

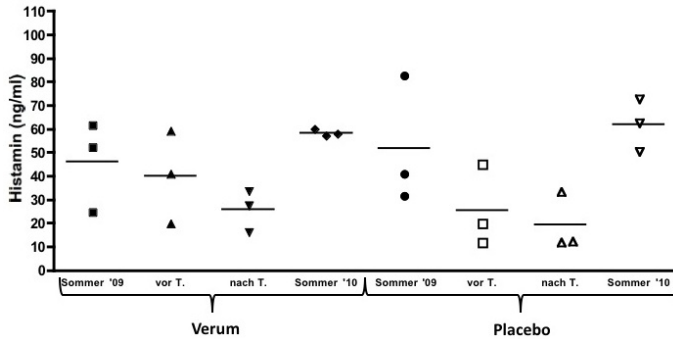


(a) Gruppe A: Histaminmessungen nach Behandlung mit 0,05mg C.-Protein, DAC/Vaseline als Creme, Verumtiere n=3, Placebotiere n=2

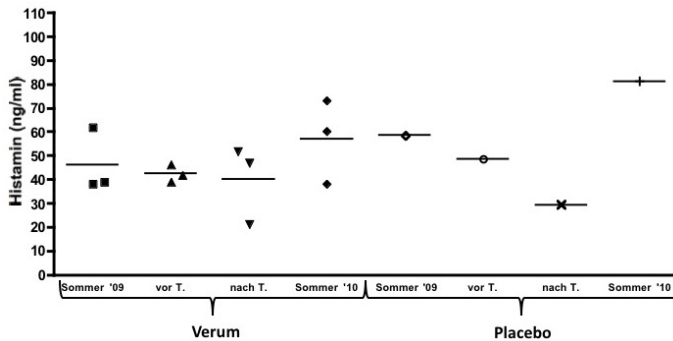
Abbildung 4.16 Histaminwerte Studie 3, Therapieverlauf 2010

um eine geringfügigen Änderung, die in der Klassifizierung nicht wiederzuerkennen ist (Abb. 4.17c).

4. Ergebnisse



(b) Gruppe B: Histaminmessung nach Behandlung mit 0,05mg C.-Protein, Vaseline als Creme, Verumtiere n=3, Placebotiere n=3



(c) Gruppe C: Histaminmessung nach Behandlung mit 0,1mg C.-Protein, DAC/Vaseline als Creme, Verumtiere n=3, Placebotiere n=1

Abbildung 4.16 Histaminwerte Studie 3, Therapieverlauf 2010

Die dritte Allergietherapiestudie wurde parallel zur Studie 2 über sechs Wochen von Januar bis März 2010 durchgeführt. Dabei bekamen die Pferde, die bisher keine EPIT erhalten hatten, die Pflastertherapie als Verum oder Placebo verabreicht. Die Tiere wurden in drei Gruppen eingeteilt. Die erste Gruppe wurde mit 0,05mg Allergen in einer DAC/Vaseline Mischung (50/50) behandelt (a), die zweite mit 0,05mg Allergen in reiner Vaseline (b) und die dritte mit 0,1mg Allergen in einer DAC/Vaseline Mischung (50/50) (c). Dargestellt sind die allergenspezifischen Histaminwerte vom Sommer 2009 (Sommer '09), zum Zeitpunkt vor der Therapie (vor T.) im Januar, nach der Therapie (nach T.) im März und vom Sommer 2010 (Sommer '10). Die abgebildete allergenspezifische Histaminkonzentration ist der prozentuale Anteil, des als 100% gewerteten maximalen Histaminwertes.

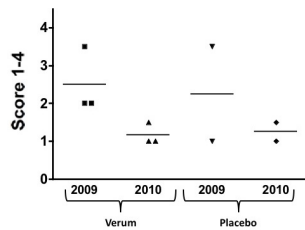
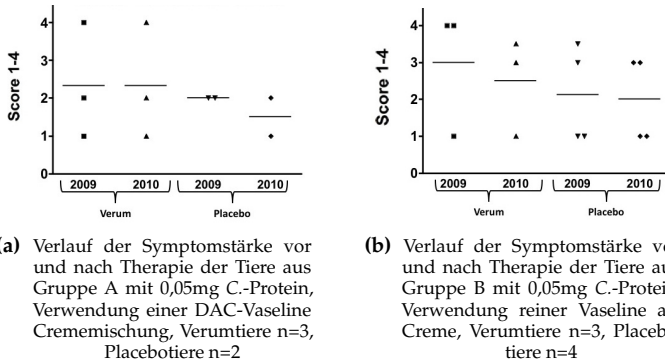


Abbildung 4.17 Klassifizierung Studie 3, Therapieverlauf 2009-2010

Im Sommer 2009 wurden weitere getestete Sommerekzemer in die Therapiestudie aufgenommen. Dabei wurden drei Gruppen gebildet, die sich wie beschrieben in der Konzentration des Allergens und in der Cremezusammensetzung unterscheiden haben. Des Weiteren erfolgte die Einteilung in Verum- und Placebobehandlung. Die Klassifizierung der Symptome fand im Juni 2009 vor der Therapie und im Juni 2010 nach der Therapie statt.

5 Diskussion

5.1 Immuntherapien

Die Standard Immuntherapie ist sowohl in der Humanmedizin, als auch in der Tiermedizin die SCIT, bei der das Allergen in steigender Dosis nach einem bestimmten Protokoll unter die Haut injiziert wird (LÖWENSTEIN und MÜLLER (2008)). Diese Therapieform wird bereits seit dem Ende des 19. Jahrhunderts praktiziert und wandelte sich vor allem im Bezug auf die Reinheit des Allergens und die Applikationsintervalle (FREW (2010)). Um die Effektivität der SCIT zu verbessern und die Nebenwirkungen zu reduzieren, wurden diverse Ansätze erprobt. Neben der Injektion des Allergens in Kombination mit dem Adjuvans Aluminiumhydroxid, um eine langsamere Absorption zu erreichen (ZOSS et al. (1937)), wird heutzutage versucht das Allergen rekombinant, als möglichst reines Peptid, herzustellen, um es nebenwirkungsfrei verabreichen zu können (LARCHE et al. (2006)). Trotz dieser Bemühungen gibt es immer wieder Patienten, die nicht auf die Therapie ansprechen und Fälle von Urtikaria, anaphylaktischem Schock und lokalen allergischen Reaktionen in Folge der SCIT (FREW (2010)). Aus diesem Grund entwickelte man die verträglichere SLIT, die für den Patienten vor allem durch ihre nadelfreie Applikation als Therapie interessant erscheint. Der Vorteil einer SLIT ist aber nicht nur in der Patiententoleranz zu sehen, sondern auch in immunologischer Hinsicht. KOOL et al. (2009) konnten zeigen, dass Injektionen wie bei einer

SCIT lokal zur Aktivierung von Th1 und Th2 Zellen führen. Diese unerwünschte Immunisierung findet bei einer SLIT nicht statt. AKDIS und AKDIS (2009b) fassten die bekannten Immunmechanismen einer SLIT zusammen und konnten feststellen, dass sie der SCIT sehr ähnlich sind: Es sind ebenfalls DZs bzw. Langerhanszellen, die die Allergene im drainierenden Lymphknoten präsentieren. Zudem werden Tr1 Zellen induziert. Demzufolge wird die Th2 Antwort reduziert und die Symptome vermindert. Eine weitere immuntherapeutische Behandlungsmethode ist die EPIT, die schon in Studien von SENTI et al. (2009a) und MONDOULET et al. (2009) publiziert wurde. Diese Therapieform zeichnet sich ebenfalls durch Nichtinvasivität und das Ausnutzen der physiologischen Mechanismen von dermalen DZs und Langerhanszellen aus. In dem Zusammenhang ist u.a. von AKBARI et al. (2001) und LUTZ und SCHULER (2002)) bekannt, dass sog. 'steady state migratorischen' DZs in der Lage sind unschädliche Fremd-Antigene/Allergene aufzunehmen, sie im drainierenden Lymphknoten zu präsentieren und dort Toleranz zu erzeugen. Dieser Mechanismus findet nicht statt, wenn das Antigen in Kombination mit Entzündungsreaktionen oder Zellerstörung (Injektion) dargeboten wird. In diesem Fall kommt es zur Reifung der DZs und zur Aktivierung von Teff Zellen (AKBARI et al. (2003), KOOL et al. (2009)). APOSTOLOU und VON BÖHMER (2008) konnten zeigen, dass durch die epikutane Applikation Toleranzmechanismen aktiviert werden. Diese induzierten Tr1 Zellen können, wie bei der SLIT, zur Verbesserung der Symptome einer Allergie führen. Somit wäre auch die EPIT als Alternative zu den genannten Immuntherapien zu betrachten. Darüber hinaus hat sie weitere Vorteile. Es fallen nicht nur die Injektionen weg, sondern auch die regelmäßige sublinguale Einnahme des Allergenextrakts. Besonders in der Tiermedizin, können sublinguale Verabreichungen von Arzneimitteln schwierig bis unmöglich sein und der Wegfall von Injektionen wird sowohl vom Patientenbesitzer, als auch vom Tier selbst begrüßt. Da die Forschung im Bereich der EPIT in den Anfängen steckt und viele Fragen bezüglich der Applikation und der Wirksamkeit noch ungeklärt sind, wurde in dieser Arbeit die Wirkungsweise einer EPIT

zuerst am Mausmodell untersucht. Die gewonnen Erkenntnisse wurden anschließend als Pilotstudie beim Pferd mit Sommerekzem umgesetzt.

5.2 EPIT am Maus-Asthma-Modell

Zur Erforschung neuartiger Immuntherapien wurde das etablierte Maus-Asthma-Modell (WOHLLEBEN et al. (2004)) verwendet und Fragen bezüglich der Pflasterapplikation und der Effektivität der Therapie untersucht.

5.2.1 EPIT in Form einer Pflastertherapie

Die Idee zur Entwicklung einer EPIT am Mausmodell basierte u.a. auf der von BYNOE et al. (2003) veröffentlichten Studie. Sie zeigten am Multiples-Sklerose-Maus-Modell (EAE), dass durch transkutane Peptidapplikation Autoimmunkrankheiten unterdrücken werden können. Auf dieser Veröffentlichung basieren die ersten Hinweise, wie ein Pflaster auf einer Maus appliziert werden kann und in welcher Konzentration ein Peptid auf die Haut aufgebracht werden muss, damit eine optimale Wirkung erzeugt wird. Hinzu kamen die Forschungsarbeiten von APOSTOLOU und VON BÖHMER (2008). Sie implantierten Mäusen mikroosmotische Pumpen unter die Haut und konnten durch die Abgabe von geringen, gleichbleibenden Mengen OVA aus den Pumpen eine Induktion von Tregs ermitteln. Da es zwar möglich ist Mäusen in der passenden Größe mikroosmotische Pumpen unter die Haut zu setzen, aber nicht dem Pferd, wurde in dieser Arbeit versucht, die Wirkung der Pumpe in Form einer speziellen Creme und mit Hilfe eines Pflasters nachzuempfinden. Nach Beratung mit der Dermatologischen Universitäts-Klinik Würzburg wurde bei der Pflastertherapie ein hypoallergenes, durchsichtiges und elastisches Pflaster, das sog. *Fixomull*® transparent, BSN medical verwendet. Das Pflaster konnte ohne Einschränkungen in der Bewegung um das gesamte Abdomen der Maus geklebt werden. Außerdem war es möglich, die Absorption der Creme zu beobachten und eine mögliche Verschmutzung unter dem Pflaster zu erkennen.

Bei ersten Pflasterversuchen stellte sich heraus, dass eine EPIT am besten auf dem rasierten Rücken der Maus durchgeführt werden konnte, da am Bauch eine sehr rasche Verschmutzung durch Kot und Streu eintrat. Aus eigenen, nicht dargestellten Versuchen zeigte sich, dass eine Verschmutzung zu einer weiteren Sensibilisierung und Verstärkung der allergischen Symptome führt. Eine tägliche Kontrolle der Mäuse und eine Erneuerung des Pflasters bei Verschmutzung war damit nötig. Eine Verletzung des Startum corneums war ein Ausschlusskriterium einer Maus aus der Studie. STRID et al. (2004), STRID et al. (2005) und STRID et al. (2006) zeigten, dass durch die Zerstörung der obersten Hautschicht Toleranzerzeugung verhindert und eine Immunisierung ausgelöst werden kann.

Ebenso wichtig, wie der Schutz vor Verschmutzung der Allergencreme und Verletzung der Haut, war die Erzeugung von Okklusion mit dem Pflaster, um eine bestmögliche Allergenabsorption zu gewährleisten (RIEDEL (2003)). Das Pflaster wurde den narkotisierten Mäuse auf den Rücken geklebt und die Randbereiche dabei gezielt angedrückt. Zur Verstärkung wurde ein zweites Pflaster darüber angebracht.

Ein weiterer wichtiger Bestandteil der EPIT war die Wahl der Salbemischung. SCHMIDT (2003) postulierte, dass amphiphile Substanzen am besten durch die Haut diffundieren. Da aber verhindert werden sollte, dass das Allergen in kürzester Zeit von der Haut absorbiert wird, wurde zu der amphiphilen DAC Basiscreme die lipophile Vaseline gemischt. Mit dieser Mischung konnte ein Depoteffekt erreicht werden, wie durch das durchsichtige Pflaster gesehen werden konnte. Die EPIT wurde stets präventiv, vor der Induktion von Asthma durchgeführt. Es wurden nur diejenigen Mäuse in die Studie aufgenommen, die das Pflaster insgesamt zehn Tage getragen haben und sich dabei keine Verletzungen oder anderen Veränderungen der Haut zugezogen haben.

5.2.2 Analyse der Immunmechanismen nach einer EPIT

Die Induktion einer aeroallergenem Atemwegsüberempfindlichkeit im Maus-Modell führt zu einer persistierenden, allergischen Atemwegspathologie. Somit können eine verstärkte Eosinophilie in den Atemwegen, sowie peribronchiale und perivaskuläre Entzündungsinfiltrate in den Bronchien identifiziert werden (CAMPBELL et al. (2009)). Diese pathologischen Veränderungen konnten durch die EPIT nicht signifikant reduziert werden. Eine Erklärung hierfür liefert die exakte Analyse der Lungenpräparate. Es wird deutlich, dass es klare 'Responder'- und 'Nonresponder'-Tiere gab. Der Grund für eine ausbleibende Reaktion auf die Immuntherapie ist dabei nicht bekannt. Möglicherweise kam es bei der Pflasterapplikation doch zu kleinen, nicht sichtbaren Mikroverletzungen oder zu einem verspäteten Pflasterwechsel, nach Verschmutzung der Allergencreme, wodurch anstelle der Toleranzerzeugung immunisiert wurde (STRID et al. (2004)).

Bezüglich der 'Responder'-Tiere konnte eine Reduktion der peribronchialen Infiltrate festgestellt werden. Ähnliche Resultate publizierten CAMPBELL et al. (2009), die eine Immuntherapie durch intradermale Injektionen durchgeführt hatten. Die Gruppe konnte zudem eine signifikante Verminderung der Eosinophilen in der BAL der Verum behandelten Tieren zeigen. CAMPBELL et al. (2009) führten den therapeutischen Erfolg auf die Aktivierung von IL-10 produzierenden T- Zellen zurück. Dies deckt sich mit den Forschungsergebnissen von APOSTOLOU und VON BÖHMER (2008). Ebenso führt die Inhalation von unschädlichen Substanzen zur IL-10 Ausschüttung von DZs und der daraus folgenden Aktivierung von IL-10 produzierenden Tr1-Zellen (AKBARI et al. (2001)). Verglichen zur Positivkontrolle konnte auch in dieser Arbeit eine signifikant erhöhte Ausschüttung von IL-10 in der BAL der 'Responder'-Tieren detektiert werden.

Betrachtet man im Einzelnen die immunologischen Mechanismen,

sowohl am Erfolgsorgan in den Lungen drainierenden Lymphknoten, in der BAL, als auch systemisch in der Milz, konnte gezeigt werden, dass es außer in der bereits erwähnten BAL, zu keiner erhöhten Ausschüttung von IL-10 gekommen war. Bereits von AKDIS und AKDIS (2009b) wurde beschrieben, dass durch eine Immuntherapie Toleranzmechanismen in Form von Tr1-Zellen aktiviert und dadurch klassische Th2 Immunantworten unterdrückt werden. Da es bei der IL-13 Zytokinanalyse weder bei den restimulierten Lymphknoten-zellen, noch in den restimulierten Milzzellen oder bei der BAL zu einem signifikanten Unterschied gekommen war, kann nicht von einer Unterdrückung der Th2 Antwort ausgegangen werden. Eine Immundeviation, wie sie häufig als therapeutischer Erfolg bei einer SCIT postuliert wird (LÖWENSTEIN und MÜLLER (2008)) und sich durch erhöhte Ausschüttung von Th1 Zytokinen, wie $\text{IFN}\gamma$ zeigt, konnte bei keiner Analyse der EPIT festgestellt werden.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass die EPIT am Mausmodell nur in der Analyse der BAL-Zytokine zu einem messbaren Erfolg geführt hat, über dessen Auswirkung Hinweise in den histologischen Schnitten der Lunge zu sehen sind. Im Vergleich zu der Anzahl an Tieren, die nur gering oder überhaupt nicht auf die Therapie reagiert haben, ist zu sagen, dass die in dieser Arbeit durchgeführte EPIT eine sehr unsichere Behandlungsform ist, bei der noch einiges an Forschungsarbeit zu verrichten ist, bis sie zu einer möglichen allergenspezifischen Immuntherapie herangezogen werden kann.

5.3 EPIT am Sommerekzem des Pferdes

Das Sommerekzem des Pferdes ist eine gut erforschte Typ I Allergie (STROTHMANN-LÜERSSEN et al. (1992)). Mit der Kenntnis des Hauptallergens und dem Wissen, dass Pferde prinzipiell auf eine Immuntherapie ansprechen (WAGNER (2005)), erschien diese

Erkrankung am geeignetsten zur Durchführung einer EPIT an einem reellen Patienten zu sein.

5.3.1 Allergiediagnostik beim Pferd

Die Diagnose einer allergischen Dermatitis ist durch die Anamnese und die visuelle Betrachtung des Pferdes einfach zu stellen. Ein Großteil dieser Patienten leidet an einer Allergie gegen die C., dem sog. Sommerexzem (KAUL (1998)). Es ist üblich diese Diagnose ohne weiterführende Untersuchungen zu stellen. Dabei ist leicht eine sich symptomatisch ähnelnde Allergie falsch diagnostiziert. Die rein optische und anamnestische Erkenntnis, dass die vorliegende Allergie das Sommerexzem ist, sollte für diese Doktorarbeit nicht genügen. Aus diesem Grund wurden die verschiedenen Allergietests näher betrachtet.

Als einziges in vivo Verfahren wird der IDT angewandt. Dabei werden verschiedene Allergene in die Haut injiziert und die Reaktion nach einer bestimmten Zeitspanne gemessen. Dieser Test wurde auf Grund der Invasivität und Aufwendigkeit in dieser Arbeit nicht durchgeführt. Neben dieser Diagnostik sind drei verschiedene in vitro Verfahren kommerziell erhältlich. Zu nennen ist dabei der sog. FcεRI-Test, bei dem das allergenspezifische IgE via ELISA detektiert wird. Bei diesem Test wird zum Teil ein rekombinanter, humaner Fcε-Rezeptor verwendet (LORCH et al. (2001)) über dessen Sensitivität kontrovers diskutiert werden kann. Es gibt weitere Ansätze von LANGNER et al. (2008) und WAGNER et al. (2003), die spezifische Aufreinigungsschritte in diesem Diagnoseverfahren etablierten und auch einen murinen, monoklonalen, pferdespezifischen Antikörper entwickelten. Dieses Verfahren erschien für die Doktorarbeit besonders mit der ermittelten 63-89% Wahrscheinlichkeit an falsch negativen Ergebnissen als ungeeignete Methode zur Allergiediagnostik.

Ebenfalls als in vitro Verfahren wird der sog. EQUINE CAST®

angeboten. Es werden dabei basophile Granulozyten aus dem Blut gewonnen, mit dem Allergen gemischt und anschließend das freigesetzte Sulfidoleukotrien im ELISA gemessen (DGAKI et al. (2009)). Ein ähnliches Prinzip wird beim FIT-Test von KAUL (1998) angewandt. Bei diesem Test werden die gesamten Blutzellen mehrfach gewaschen und anschließend mit dem Allergen in Verbindung gebracht. Liegt bei dem untersuchten Patienten eine Allergie gegen die Substanz vor, mit der das Blut gemischt wurde, so kann in einem RIA eine erhöhte Menge an Histamin gemessen werden. Dieses Verfahren wird von RÜSBÜLDT (2007) als sichere Diagnostik bezeichnet. Sowohl der EQUINE CAST[®], als auch der FIT-Test sollen während und nach der Allergiesaison zuverlässige Ergebnisse liefern (RÜSBÜLDT (2007)). Ein Vergleich der beiden Verfahren wurde bisher nicht durchgeführt.

Als sicherste, und für diese Dissertation am einfachsten zu realisierende Methode, erschien das In-vitro-Verfahren von KAUL (1998). Allerdings war zu diesem Zeitpunkt der Histamin-RIA nicht mehr kommerziell erhältlich. Die Firma LDN Labordiagnostika Nordhorn entwickelte zeitgleich einen 'Histamin Research ELISA', der im Verlauf der Arbeit im Bezug auf allergische Pferde etabliert wurde. Da ein ELISA deutlich insensitiver ist, als ein RIA, musste das ursprüngliche Verfahren des FIT-Tests abgewandelt werden. Es wurde das von DIETZE et al. (2008) beschriebene Blutseparationsverfahren angewandt und nach zwei spezifischen Auftrennungsschritten lagen die granulozytären Zellen getrennt vom Gesamtblut vor. Anschließend wurden diese Zellen mit dem Allergen, dem Lyophilisat der C., gemischt und das freigesetzte Histamin im 'Research ELISA' gemessen.

Diese Diagnostik war während der 1. Studie noch nicht verfügbar. Aus diesem Grund wurden die Pferde rein symptomatisch beurteilt und anschließend behandelt. Im Sommer 2009 war das neue Testverfahren etabliert und es war möglich zwischen gesunden Pferden, Nicht-*Culicoides*-Allergikern und Sommerrekzemern zu unterscheiden.

Das Testverfahren wurde sowohl während der Sommermonate, bei

deutlicher Allergiesymptomatik, als auch in den symptomfreien Wintermonaten durchgeführt. Es zeigte sich, dass eine deutlich geringere, allergenspezifische Histaminmenge im Winter gemessen werden konnte. Trotz allem kann, wie es auch bei der Durchführung des FIT-Tests behauptet wurde, zwischen *Culicoides*-Allergikern, anderen Allergikern und gesunden Pferden unterschieden werden, allerdings mit einer geringeren Genauigkeit. Aus diesem Grund wurden nur die Ergebnisse der Sommermonate rückwirkend auf die Pferde der Studie 1 gewertet. Es wurden nur *Culicoides* positive Pferde mit in die Studie 2 und 3 aufgenommen.

5.3.2 Allergietherapie beim Pferd

Bei der Durchführung der EPIT wurde, wie am Mausmodell, das Pflaster *Fixomull*® transparent, BSN medical verwendet, da es sich mit seinen Eigenschaften als ideal herausgestellt hat. Außerdem wurden die selben Salben (Vaseline und DAC Basiscreme) als Grundlage benutzt, allerdings in anderen Zusammensetzungen, wie bereits unter 4.3 erläutert. Die erste Schwierigkeit bestand in der Wahl der Applikationsstelle des Pflasters. Der Bereich musste einfach unter Okklusion zu bringen sein und durfte das Pferd nicht im Bewegungsablauf behindern. Außerdem sollte das Pflaster mindestens eine Woche kleben bleiben, damit die gesamte Allergenmenge absorbiert werden konnte. Somit blieb das Röhrbein als mögliche Applikationsstelle. Da die Durchblutung in diesem Bereich nicht allzu hoch ist und das Allergen zudem eine höhere Molekularität besitzt, wurde versucht das Allergen durch Okklusionserzeugung zur Diffusion durch die Haut zu bekommen (RIEDEL (2003)). Aufgrund der Hinweise von WWW.VETIDATA.DE (2010) wurde der Penetrationsförderer Dimethylsulfoxid (kurz: DMSO) nicht in die Salbenmischung mit eingerührt. DMSO sollte laut WWW.VETIDATA.DE (2010) nicht unter Bandagen angewandt werden. Da das Pflaster einen Hautbereich ähnlich einer Bandage komplett verschließt, wurde von der Zugabe

dieses Sulfoxids abgesehen.

Zur Bestimmung, ob es durch die EPIT zur Verminderung der Symptome gekommen war, wurde die beschriebene Pilotstudie Placebokontrolliert durchgeführt. Eine exaktere immunologische Untersuchung der klinischen Wirkung war zum damaligen Zeitpunkt nicht möglich, da die dafür nötigen pferdespezifischen Antikörper und ELISAs nicht zur Verfügung standen. In der Publikation von STEINBACH et al. (2002) wird zwar gezeigt, dass das humane Zytokin IL-10 zu 90% homolog zu dem des Pferdes ist, der Versuch IL-10 im Serum der Pferde durch einen humanen IL-10 ELISA detektieren zu können, scheiterte aber auf Grund von kaum messbaren Werten. Weitere Bemühungen in dieser Hinsicht sind von WAGNER und FREER (2008) publiziert, aber noch keiner der hier etablierten 'Multiplex assays' der Zytokine IL-4, IL-10 und IFN- α sind kommerziell erhältlich. Aus diesem Grund wurde der Erfolg der Therapie an zwei verschiedenen Parametern gemessen:

1. Messung des allergenspezifischen Histamins im Sommer vor der Therapie, während der Therapie und im folgenden Sommer.
2. Klassifizierung der Symptome im Sommer vor und nach der Therapie.

Messung des allergenspezifischen Histamins

Der Gedanke das allergenspezifische Histamin als Parameter für eine therapeutische Wirksamkeit heran zu ziehen, kam mit dem Wissen, dass es durch die Synthetisierung von IL-10 und die Induktion von Tregs zu einer Suppression der Mastzellen und der eosinophilen Granulozyten kommt und damit zur verminderten Freisetzung von Histamin (AKDIS und AKDIS (2009a)). Wie den Ergebnissen zu entnehmen ist, konnte in der Verum-Gruppe nur in einzelnen Fällen eine verminderte Ausschüttung an Histamin

detektiert werden. Dies kann zum einen zeigen, dass die Therapie in vielen Fällen nicht erfolgreich war. Zum anderen ist es möglich, dass die induzierten Toleranzmechanismen nicht ausgereicht haben, um eine messbare Reduktion der Histaminkonzentration zu bewirken. Diese Vermutung wird unterstützt von dem Wissen, dass Mastzellen Monate bis Jahre im Gewebe überleben können (ISHIZAKA et al. (1993)) und es fraglich ist, ob Toleranzmechanismen nach so kurzer Zeit supprimierend auf diese Zellen Einfluss nehmen können.

Symptomklassifizierung

Die Einteilung der Klassifizierung beruht auf den von GEIBEN (2003) untersuchten Hauptlokalisationen der Symptome des Sommerexzems. Sie zeigte, dass in einer Vielzahl von Fällen vor allem am Kopf, am Mähnenkamm, an der Bauchnaht und an der Schweiffrübe Veränderungen durch den Juckreiz zu sehen waren. Seltener waren Symptome an den Beinen zu erkennen und nur in extremen Fällen waren blutende und eitrig Wunden zu sehen. Bei den Tieren, die eine EPIT als Immuntherapie verabreicht bekamen, wurde die Haut jeweils vor und nach der Therapie gründlich untersucht. Zusätzlich wurde eine Befragung der Besitzer über den Verlauf der Symptome durchgeführt. Direkt nach der Begutachtung fand die Klassifizierung statt. Es stellte sich heraus, dass es auch symptomatisch kaum zu einer Besserung nach der Therapie gekommen war. Interessanterweise behaupteten einige Besitzer einen Unterschied zum Sommer vor der Therapie zu bemerken und dies waren ausschließlich Besitzer, bei denen das Pferd eine Verum-Behandlung erhalten hatte. Diese Vermutung konnte durch diese Klassifizierung nicht zum Ausdruck gebracht werden.

5.3.3 Ausblick

Die Ergebnisse aus den Mausversuchen zeigten einen Hinweis, dass Toleranzmechanismen durch eine EPIT aktiviert werden können. Ebenso konnten SENTI et al. (2009a) am Menschen und MONDOULET et al. (2009) am Mausmodell zeigen, dass durch eine EPIT ein therapeutischer Erfolg erzielt werden kann. Aus welchem Grund es bei den Pferden zu keiner oder nur vereinzelter Besserung der Symptome gekommen war, lässt sich nur vermuten. Es ist jedoch klar, dass bezüglich der EPIT noch viele Fragen ungeklärt sind. Gerade im Bezug auf die Dosis, das Applikationsintervall und den -Ort, und nicht zuletzt den Zeitpunkt des Therapiebeginns, gibt es noch viel zu erforschen.

Mit dieser Arbeit sollte ein Anfang im Bezug auf das Entwickeln von transdermalen Immuntherapien in der Veterinärmedizin gemacht werden. Dieses spannende Forschungsgebiet ist dabei sicherlich auch gut auf die allergischen Patienten Hund und Katze zu übertragen. Nicht zuletzt führen die Erkenntnisse in der Tiermedizin gleichzeitig zu einer Weiterentwicklung der humanmedizinischen Versorgung.

6 Zusammenfassung

Epikutane Toleranzinduktion am Maus-Asthma-Modell und beim Sommerekzem des Pferdes

Thema dieser Arbeit war es, eine Immuntherapie zu entwickeln, bei der das Allergen nicht invasiv, über die intakte Haut verabreicht wird. Diese epikutane, allergenspezifische Immuntherapie (EPIT) wurde in Form einer Pflastertherapie am Maus-Asthma-Modell erforscht und am Sommerekzem des Pferdes angewandt.

Maus-Asthma-Modell

Das Maus-Asthma-Modell ist ein etabliertes Tiermodell zur Erforschung der Typ I Allergie. An diesem Mausmodell wurde die Immunantwort nach einer EPIT analysiert.

Für die Immuntherapie wurde das Allergen in einer Crememischung, unter einem Pflaster auf die Haut appliziert und nach der Behandlung allergisches Asthma induziert. Im Anschluss wurde die Bronchoalveolare Lavage (BAL) zytologisch untersucht. Zudem wurde die Freisetzung der Zytokine IL-10, IL-13, IFN γ des Lungen drainierenden Lymphknotens, der BAL und der Milz im Hinblick auf den Status der Tr1, Th2 und Th1 Antwort gemessen. Außerdem erfolgte eine histologische Beurteilung der Mäuslungen.

In der Analyse der Lungenschnitte musste festgestellt werden, dass nicht alle Mäuse auf eine EPIT angesprochen haben und es sog.

'Responder'- und 'Nonresponder'-Tiere gab. Ein ähnliches Bild konnte bei den Zytokin Untersuchungen festgestellt werden. Durch die Unterscheidung der Tiere, ob sie auf die Therapie angesprochen haben oder nicht, konnte bei den 'Responder'-Mäusen eine erhöhte Ausschüttung IL-10 (Tr1 Zellen) in der BAL detektiert werden. In den Milzen und den analysierten Lymphknoten wurde keine verstärkte Freisetzung von IL-10 festgestellt. Ebenfalls ohne signifikantes Ergebnis verlief die Analyse des Zytokins IL-13 - es konnte kein Hinweis für eine Unterdrückung der allergietypischen Th2 Immunantwort festgestellt werden. Bei der Analyse des Th1 Zytokins IFN γ konnte keine verstärkte Freisetzung des Interferons erkannt und eine Immundeviation als mögliche positive Auswirkung der EPIT ausgeschlossen werden.

Das Sommerkeczem des Pferdes

Das Sommerkeczem ist eine Allergie vom Typ I auf den Stich der Kriebelmücke (*Culicoides spp.*). Die Symptome dieser saisonalen Hypersensitivität äußern sich vor allem durch Juckreiz, den durch zu starkes Scheuern entstanden Wunden und sekundären Entzündungen. Diese Reaktionen können aber auch durch andere Allergene ausgelöst werden. Da für die Durchführung der EPIT im Rahmen dieser Arbeit nur Pferde mit einer C.- Allergie gesucht wurden, wurde das In-vitro-Diagnoseverfahren von Susanne Kaul herangezogen und spezifiziert. Durch das Verfahren konnten C.-Allergiker, von anderen Allergikern und gesunden Tieren unterschieden werden. An den ermittelten C.-positiven Pferden wurde in der symptomfreien Zeit die EPIT als placebokontrollierte Pilotstudie durchgeführt. In dieser Zeit wurde das Pflaster wöchentlich gewechselt. Für die Messbarkeit eines Therapieerfolges wurde im Sommer vor der Therapie und im Jahr darauf eine Symptom-Klassifizierung

durchgeführt und die Resultate miteinander verglichen. Des Weiteren wurden die allergenspezifischen Histaminwerte im Sommer vor und nach der Therapie, und während der Durchführung der Therapie bestimmt.

Es stellte sich heraus, dass die Therapie in einzelnen Fällen einer Besserung bewirkt zu haben schien, ein klarer Erfolg war jedoch weder in der Betrachtung des allergenspezifischen Histamins, noch bei der Beurteilung der Symptome zu erkennen.

7 Summary

Epicutaneous tolerance induction in a mouse asthma model and for the sweet itch of horses

The allergen specific epicutaneous immunotherapy (EPIT) is a new way to treat Typ I allergic reactions. To evaluate the efficacy of this EPIT, we made experiments with a mouse asthma model. As a next step we treated horses with the EPIT. Those horses suffer from a type I allergy against *Culicoides ssp.*, the so called sweet itch.

The mouse asthma model

This mouse model is well established as an type I allergy animal model. The mice were treated with an allergen-ointment mixture or the ointment mixture alone as a control. Afterwards allergic asthma was induced and the immunological answer analyzed. We looked for the cytology of the Bronchoalveolar Lavage (BAL) and the released cytokines IL-10, IL-13, IFN γ in the BAL, the lung draining lymph nodes and the spleen. Furthermore we analyzed the lung histological. Especially during the examination of the lung, we recognized that there are 'Responder' and 'Non-Responder' mice in the allergen-ointment treated group. A similar result was noticed during the analysis of the cytokines. With the differentiation of 'Responder' and 'Non-Responder' mice it was possible to detect an increase of IL-10 in the BAL of 'Responder' mice. This could be

valued as an induction of Tr1 cells. All the other results were not significant. There was no higher release of IL-10 in the supernatant of the draining lymph node and the spleen. Further was no reduction of the Th2 typical cytokine IL-13 measured. In addition it was not possible to detect an increase of the Th1 cytokine IFN γ . For that we concluded that no immunedeviation took place as an effect of the EPIT.

The sweet itch of horses

Before the treatment of the horses could be realized an allergy testing had to be done. For this we separated the blood granulocytes and restimulated them with the allergen *Culicoides nubeculosus*, like Kaul published it in 1998. This treatment of the blood cells leads to an allergen specific release of histamine which could be detected via ELISA. After that, all *Culicoides* positive horses were part of the placebo controlled pilot study and were checked for their symptoms in a scoring-system. The EPIT of the horses was arranged during the symptom free period of the year. The horses were shaved at their leg and the ointment was applied under a plaster. This plaster was changed weekly. For evaluation of a therapeutical success the scoring from the summer before and after the treatment was compared. Also the allergen-specific histamine values were checked in these periods and additionally directly before and after the treatment in the winter months. As a result we obtain very few verum-treated horses showing a positive effect after the therapy. In the most cases no difference between the placebo and verum group was detectable.

Literaturverzeichnis

- AKBARI O., DEKRUYFF R. und UMETSU D. (2001) *Pulmonary dendritic cells producing IL-10 mediate tolerance induced by respiratory exposure to antigen*. *Nat Immunol* **2**: 725–731.
- AKBARI O., STOCK P., DEKRUYFF R. und UMETSU D. (2003) *Role of regulatory T cells in allergy and asthma*. *Curr Opin Immunol* **15**: 627–633.
- AKDIS C.A. und AKDIS M. (2009a) *Mechanisms and treatment of allergic disease in the big picture of regulatory T cells*. *Allergy, Asthma and Immunology* **123**: 735–743.
- AKDIS C.A., AKDIS M., BLESKEN T., WYMAN D., ALKAN S.S., MÜLLER U. und BLASER K. (1996) *Epitope-specific T cell tolerance to phospholipase A2 in bee venom immunotherapy and recovery by IL-2 and IL-15 in vitro*. *Journal of Clinical Investigation* **98**: 1676–1683.
- AKDIS C.A., BLESKEN T., AKDIS M., WUTHRICH B. und BLASER K. (1998) *Role of interleukin 10 in specific immunotherapy*. *Journal of Clinical Investigation* **102**: 98–106.
- AKDIS M. (2009) *Immune tolerance in allergy*. *Immunology* **21**: 1–8.
- AKDIS M. und AKDIS C. (2009b) *Therapeutic manipulation of immune tolerance in allergic disease*. *Nature* **8**: 645–660.

- AKDIS M., VERHAGEN J., TAYLOR A., KARAMLOO F., KARAGIANNIDIS C., CRAMERI R., THUNBERG S., DENIZ G., VALENTA R. und FIEBIG H. (2008) *Immune responses in healthy and allergic individuals are characterized by a fine balance between allergen-specific T regulatory 1 and T helper 2 cells*. *Immunity* **199**: 1567–1575.
- ALTHAUS H., MÜLLER N., BUSATOC A., MELLORD P.S., TORSTEINSDOTTIR S. und MARTI E. (2004) *Cloning and sequencing of a cDNA expressing a ribosomal P0 peptide from Culicoides nubeculosus (Diptera)*. *Veterinary Immunology and Immunopathology* **99**: 99–111.
- ANDERSON G., BELTON P. und KLEIDER N. (1993) *Hypersensitivity of horses in British Columbia to extracts of native and exotic species of Culicoides (Diptera: Ceratopogonidae)*. *Journal Med Entomol* **30**: 657–663.
- ANDERSON G.S., BELTON P., JAHREN E., LANGE H. und KLEIDER N. (1996) *Immunotherapy trial for horses in British Columbia with Culicoides (Diptera: Ceratopogonidae) hypersensitivity*. *Journal of Medical Entomology* **33**: 458–466.
- APOSTOLOU I. und VON BÖHMER H. (2008) *In Vivo Instruction of Suppressor Commitment in Naïve T Cells*. *Journal of Experimental Medicine* **199**: 1401–1408.
- BAKER K. und QUINN P. (1978) *A report on clinical aspects and histopathology of sweet itch*. *Equine Vet Journal* **10**: 243–248.
- BALCZUN C., VORSPRACH B., MEISER C.K. und SCHAUB G.A. (2009) *Changes of the abundance of Culicoides obsoletus s.s. and Culicoides scoticus in Southwest Germany identified by a PCR-based differentiation*. *Parasitol Res* **105**: 345–349.
- BANCHEREAU J. und STEINMAN R. (1998) *Dendritic cells and the control of immunity*. *Nature* **392**: 245–252.

- BARBET J., BEVIER D. und GREINER E. (1990) *Specific immunotherapy in the treatment of Culicoides hypersensitive horses: a double-blind study*. Equine Vet Journal **22**: 232–235.
- BASELGIA S., DOHERR M., MELLOR P., TORSTEINSDOTTIR S., JERMANN T., ZUBRIGGEN A., JUNGI T. und MARTI E. (2006) *Evaluation of an in vitro sulpholeukotriene release test for diagnosis of insect bite hypersensitivity in horses*. Equine Vet Journal **38**: 40–46.
- BERGER I., GRABNER A., SCHÖNERT S. und STERNER-KOCK A. (2006) *Das Sommerexzem des Pferdes - Ein Therapievergleich*. Poster.
- BERGMANN K. (2006) *Clemens Freiherr von Pirquet, developer of the concept of allergy*. MMW Fortschr Med **148**: 24–25, 27.
- BJÖRNSDOTTIR S., SIGVALDADOTTIR J., BROSTROEM H., LANGVAD B. und A. SIGURDSSON (2006) *Summer eczema in exported Icelandic horses: influence of environmental and genetic factors*. Acta Veterinaria Scandinavica **48**: 1–4.
- BLAMOUTIER P., BLAMOUTIER J. und GUIBERT L. (1959) *Treatment of pillinosis with pollen extracts by the method of cutaneous quadrille ruling [in French]*. Presse Med **67**: 2299–2301.
- BOUSQUET J., BIEBER T., FOKKENS W., KOWALSKI M.L., HUMBERT M., NIGGEMANN B., SIMON H., BURNEY P., VAN CAUWENBERGE P., ZUBERBIER T., AKDIS C. und DEMOLY P. (2007) *Important questions in allergy: novel research areas*. Allergy **63**: 143–147.
- BOUSQUET J., LOCKEY R., MALLING H.J., ALVAREZ-CUESTA E., CANONICA G.W., CHAPMAN M.D., CRETICOS P.J., DAYER J.M., DURHAM S.R., DEMOLY P., GOLDSTEIN R.J., ISHIKAWA T., ITO K., KRAFT D., LAMBERT P.H., LOWENSTEIN H., MÜLLER U., NORMAN P.S., REISMAN R.E., VALENTA R., VALOVIRTA E. und YSSEL H. (1998) *Allergen immunotherapy: therapeutic vaccines for*

- allergic diseases*. World Health Organization, American Academy of Allergy, Asthma and Immunology Annals of Allergy, Asthma and Immunology **81**: 401–405.
- BRAVERMAN Y. (1988) *Preferred landings sites of Culicoides species (Diptera: Ceratopogonidae) on a horse in Israel and its relevance to summer seasonal recurrent dermatitis (sweet itch)*. Equine Journal **20**: 426–429.
- BULEK K., SWAIDANI S., ARONICA M. und LI X. (2010) *Epithelium: the interplay between innate and Th2 immunity*. Immunol Cell Biol **88**: 257–268.
- BÜTTNER R., THOMAS C., FEND F., MENNEL H.D., MOLL R., SCHMID K.W. und SCHMITZ-MOORMANN P. (2002) Allgemeine Pathologie. Schattauer Verlag, Stuttgart, New York.
- BYNOE M.S., EVANS J.T., VIRET C. und CHARLES A. JANEWAY J. (2003) *Epicutaneous Immunization with Autoantigenic Peptides Induces T Suppressor Cells that Prevent Experimental Allergic Encephalomyelitis*. Immunity **19**: 317–328.
- CAMPBELL J.D., BUCKLAND K.F., MCMILLAN S.J., KEARLEY J., OLDFIELD W.L., STERN L.J., GRÖNLUND H., VAN HAGE M., REYNOLDS C.J., BOYTON R.J., COBBOLD S.P., KAY A.B., ALTMANN D.M., LLOYD C.M. und LARCHE M. (2009) *Peptide immunotherapy in allergic asthma generates IL-10 dependent immunological tolerance associated with linked epitope suppression*. Journal of Experimental Medicine **206**: 1535–1547.
- CLAUSEN B.E. und KEL J.M. (2010) *Langerhans cells: critical regulators of skin immunity?*. Immunol Cell Biol **88**: 351–360.
- COMMINS S.P., BORISH L. und STEINKE J.W. (2010) *Immunologic messenger molecules: Cytokines, interferons, and chemokines*. J Allergy

Clin Immunol **125**: 53–72.

DEEGEN E. und GLITZ F. (2002) Praxisorientierte Anatomie und Propädeutik des Pferdes. 2. Auflage. Verlag M und H Schaper, Hannover.

DGAKI, RENZ H., BIEDERMANN T., BUFE A., EBERLEIN B., JAPPE U., OLLERT M., PETERSEN A., KLEINE-TEBBE J., RAULF-HEIMSOOTH M., SALOGA J., WERFEL T. und WORM M. (2009) DGAKI: Leitlinie zur in-vitro Allergiediagnostik.

DIETZE B. (2009) Generierung und Allergenbeladung von Dendritischen Zellen des Pferdes für eine künftige Immuntherapie des Sommerekzems. Ph.D. thesis, Veterinärmedizinische Fakultät der Universität Leipzig.

DIETZE B., CIERPKA E., SCHÄFER M., SCHILL W. und LUTZ M. (2008) *An improved method to generate equine dendritic cells from peripheral blood mononuclear cells: divergent maturation programs by IL-4 and LPS*. Immunobiology **213**: 751–758.

EBNER C., SIEMANN U., BOHLE B., WILLHEIM M., WIEDERMANN U., SCHENK S., KLOTZ F., EBNER H., KRAFT D. und SCHEINER O. (1997) *Immunological changes during specific immunotherapy of grass pollen allergy: reduced lymphoproliferative responses to allergen and shift from TH2 to TH1 in T-cell clones specific for Phl p 1, a major grass pollen allergen*. Clinical Experimental Medicine **27**: 1007–1015.

ELLIOTSON D. (1833) *Disease of the chest*. London medical Gazette **284**: 161–171.

ERIKSSON S., GRANDINSON K., FIKSE W.F., LINDENBERG L., MIKKO S., BROSTRÖM H., FREY R., SUNDQUIST M. und LINDGREN G. (2008) *Genetic analysis of insect bite hypersensitivity (summer eczema) in Icelandic horses*. Animal **3**: 360–365.

- EYERICH K., HUSS-MARP J., DARSOW U., WOLLENBERG A., FOERSTER S., RING J., BEHRENDT H. und TRAUDL-HOFFMANN C. (2008) *Pollen grains induce a rapid and biphasic eczematous immune response in atopic eczema patients*. *Int Arch Allergy Immunol* **145**: 213–223.
- FADOK V. und GREINER E. (1990) *Equine insect hypersensitivity: skin test and biopsy results correlated with clinical data*. *Equine Vet J* **22**: 236–240.
- FELDMANN R. und MAIBACH H. (1967) *Regional variation in percutaneous penetration of 14C hydrocortisone in man*. *Journal Invest Dermatol* **48**: 181–183.
- FERROGLIO E., PREGEL P., ACCOSSATO A., TARICCO I., BOLLO E., ROSSI L. und TRISCIUOGGIO A. (2006) *Equine Culicoides Hypersensitivity: Evaluation of a Skin Test and of Humoral Response*. *Journal of Veterinary Medicine* **53**: 30–33.
- FREW A.F. (2010) *Allergen Immunotherapy*. *J Allergy Clin Immunol* **125**: 306–313.
- GALLI S.J., GRIMBALDESTON M. und TSAI M. (2008a) *Immunomodulatory mast cells: negative, as well as positive, regulators of immunity*. *Nature* **8**: 478–486.
- GALLI S.J., TSAI M. und PILIPONSKY A.M. (2008b) *The development of allergic inflammation*. *Nature* **454**: 445–454.
- GEIBEN T. (2003) Untersuchungen zum Sommerexzem sowie zum Einfluss des Immunmodulators Baypamun N auf die Typ I-Allergie der Pferde. Ph.D. thesis, Tierärztliche Hochschule Hannover.
- GELL P. und COOMBS R. (1968) Clinical aspects of immunology. Classification of allergic reactions for clinical hypersensitivity

- disease. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- GERBER H., LÖFFLER K. und STRAUCH D. (1994) Pferdekrankheiten Band 1: Innere Medizin einschliesslich Dermatologie. UTB für Wissenschaft, Stuttgart.
- GOLDSMITH L. (1991) Physiology, Biochemistry and Molecular Biology of the Skin. Oxford University Press, New York.
- GREINER E., FADOK V. und RABIN E. (1990) *Equine Culicoides hypersensitivity in Florida: biting midges aspirated from horses*. Med Vet Entomol **4**: 375–381.
- VAN DER HAEGEN A., GRIOT-WENK M., WELLE M., BUSATO A., VON TSCHARNER C., ZURBRIGGEN A. und MARTI E. (2001) *Immunoglobulin-E-bearing cells in skin biopsies of horses with insect bite hypersensitivity*. Equine Vet J **33**: 699–706.
- HAHN C., TEUFEL M., HERZ U., RENZ H., ERB K.J., WOHLLEBEN G., BRÖCKER E.B., DUSCHL A., SEBALD W. und GRUNEWALD S.M. (2003) *Inhibition of the IL-4/IL-13 receptor system prevents allergic sensitization without affecting established allergy in a mouse model for allergic asthma*. Journal of Allergy and Clinical Immunology **11**: 1361–1369.
- HALLDORSÐÓTTIR S., LARSEN H. und MEHL R. (1989) *Intradermal challenge of Icelandic horses with extracts of four species of the genus Culicoides*. Journal of Veterinary Research **47**: 238–287.
- HAMADA M., TAKECHI M. und ITAKURA C. (1992) *Langerhans' cells in equine cutaneous papillomas and normal skin*. Vet Pathol **29**: 152–160.
- HAMMAD H., CHIEPPA M., PERROS F., WILLART M., GERMAIN R. und LAMBRECHT B. (2009) *House dust mite allergen induces asthma*

- via Toll-like receptor 4 triggering of airway structural cells. Nature Medicine* **15**: 410–6.
- HAMMAD H. und LAMBRECHT B.N. (2008) *Dendritic cells and epithelial cells: linking innate and adaptive immunity in asthma. Nature Reviews Immunology* **8**: 193–204.
- HAMPEL S. (2007) Examination and modulation of type-I-immunoreactivity in horses monitored by means of a functional in vitro test (FIT) and intradermal testing (IDT). Ph.D. thesis, Tierärztliche Hochschule Hannover.
- 3RD HAVEMEYER WORKSHOP, MARTI E., GERBER V., WILSON A., LAVOIE J., HOROHOV D., CRAMERI R., LUNN D., ANTCHAK D., BJÖRNSDÖTTIR S., CUNNINGHAM F., DERER M., FREY R., HAMZA E., HORIN P., HEIMANN M., KOLM-STARK G., OLAFSDÓTTIR G., RAMERY E., RUSSELL C., SCHAFFARTZIK A., SIAF, SVANSSON V., TORSTEINSDÓTTIR S. und WAGNER B. (2007) *Report of the 3rd Havemeyer workshop on allergic diseases of the Horse, Holar, Iceland. Veterinary Immunology and Immunopathology.*
- HOGAN S.P. (2007) *Recent Advances in Eosinophil Biology. Int Arch Allergy Immunology* **143**: 3–14.
- HÖRBRAND T. und GEIER M. (2009) *Monitoring of Culicoides at nine locations in Southern Germany (2007–2008). Parasitol Res* **105**: 387–92.
- ISHIZAKA T., MITSUI H., YANAGIDA M., MIURA T. und DVORAK A. (1993) *Development of human mast cells from their progenitors. Curr Opin Immunol* **5**: 937–943.
- JAMESON J.M., SHARP L.L., WITHERDEN D.A. und HAVRAN W.L. (2004) *Regulation of skin cell homeostasis by gamma delta T cells. Front Bioscience* **9**: 2640–2651.

- JANEWAY C.A., TRAVERS P., WALPERT M. und SHLOMCHIK M. (2002) Immunologie. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin.
- JUNGI T.W., BIGLER B., GASCHEN F., GERBER H., GRIOT-WENK M.E., MARTI E., SPRENG D., SUTER M. und TIPOLD A. (2000) Klinische Veterinärimmunologie. Enke im Hippokrates Verlag, Stuttgart.
- KALESNIKOFF J. und GALLI S.J. (2008) *New developments in mast cell biology*. Nature **9**: 1215–1223.
- KAUL S. (1998) Typ-I-Allergien beim Pferd: Prinzipielle Entwicklung eines funktionellen in vitro Nachweises. Ph.D. thesis, Tierärztliche Hochschule Hannover.
- KIEL E., LIEBISCH G., FOCKE R. und LIEBISCH A. (2009) *Monitoring of Culicoides at 20 locations in northwest Germany*. Parasitol Res **105**: 1–7.
- KIETZMANN M., SCHERKL R. und SCHULZ R. (2002) Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie. Enke Verlag, Stuttgart.
- KOBELT C. (2001) Zum Sommerexzem, eine Typ I-Allergie beim Islandpferd: Verlauf der in vivo-Sensibilisierung von basophilen Granulozyten nachgewiesen mit einem funktionellen in vitro-Test (FIT). Ph.D. thesis, Tierärztliche Hochschule Hannover.
- KOCH E. (1985) Pharmakokinetische Aspekte von Dermatika. in: Externe Therapie von Hautkrankheiten. Thieme, Stuttgart, New York.
- KOLM-STARK G. und WAGNER R. (2002) *Intradermal skin testing in Icelandic horses in Austria*. Equine Journal **34**: 405–410.

- KOOL M., SOULLIE T., VAN NIMWEGEN M., M.A.M.WILLART, MUSKENS F., JUNG S., HOOGSTEDEN H.C., HAMMAD H. und LAMBRECHT B.N. (2009) *Alum adjuvant boosts adaptive immunity by inducing uric acid and activating inflammatory dendritic cells*. Journal of Experimental Medicine **205**: 869–882.
- KRAFT W. und DÜRR U. (1999) Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin. Schattauer Verlag, Stuttgart, New York.
- LAMBRECHT B.N. (1996) Contribution of Dendritic Cells to the induction and maintenance of eosinophilic airway inflammation. Verlag: privat.
- LAMBRECHT B.N. und HAMMAD H. (2008) *Lung Dendritic Cells: Targets for Therapy in Allergic Disease*. Chem Immunol Allergy **94**: 189–200.
- LAMBRECHT B.N. und HAMMAD H. (2009) *Biology of Lung Dendritic Cells at the Origin of Asthma*. Cell **31**: 412–424.
- LANGNER K.F., DARPEL K.E., DROLET B.S., FISCHER A., HAMPEL S., HESELHAUS J.E., MELLOR P.S., MERTENS P.P. und LEIBOLD W. (2008) *Comparison of cellular and humoral immunoassays for the assessment of summer eczema in horses*. Veterinary Immunology and Immunopathology **122**: 126–137.
- LANGNER K.F.A. (2005) Das Sommerexzem des Pferdes: Untersuchungen zu potentiellen Allergenen aus *Culicoides nubeculosus*. Ph.D. thesis, Tierärztliche Hochschule Hannover.
- LARCHE M., AKDIS C. und VALENTA R. (2006) *Immunological mechanisms of allergen-specific immunotherapy*. Nat Rev Immunol **6**: 761–771.

- LLOYD C. und HAWRYLOWICZ C.M. (2009) *Regulatory T Cells in Asthma*. Cell **31**: 438–449.
- LOCKSLEY R.M. (2010) *Asthma and Allergic Inflammation*. Cell **140**: 777–783.
- LORCH G., HILLIER A., KWOCHKA K., SAVILLE W.J., KOHN C.W. und LEROY B.E. (2001) *Comparison of immediate intradermal test reactivity with serum IgE quantitation by use of a radioallergenabsorbent test and two ELISA in horses with and without atopy*. Vet Med Assoc **218**: 1314–1322.
- LÖWENSTEIN C. und MÜLLER R. (2008) *A review of allergen-specific immunotherapy in human and veterinary medicine*. Journal Compilation **20**: 84–98.
- LUTZ M.B., DÖHLER A. und AZUKIZAWA H. (2010) *Revisiting the tolerogenicity of epidermal Langerhans cells*. Immunology and Cell Biology **88**: 381–386.
- LUTZ M.B. und KURTS C. (2009) *Induction of peripheral CD4+ T-cell tolerance and CD8+ T-cell cross-tolerance by dendritic cells*. Eur J Immunol **39**: 2325–233.
- LUTZ M.B. und SCHULER G. (2002) *Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity?*. Trends in Immunology **25**: 569–569.
- MAHNKE K., SCHMITT E., BONIFAZ L., ENK A. und JONULEIT H. (2002) *Immature, but not inactive: the tolerogenic function of immature dendritic cells*. Immunol Cell Biology **80**: 477–483.
- MARTI E., GERBER H. und LAZARY S. (1992) *On the genetic basis of equine allergic diseases: II. Insect bite dermal hypersensitivity*. Equine Vet J **24**: 113–117.

- MARTI E., URWYLER A., NEUENSCHWANDER M., EICHER R., MEIER D., DE WECK A., GERBER H., LAZARY S. und DAHINDEN C. (1999) *Sulfidoleukotriene generation from peripheral blood leukocytes of horses affected with insect bite dermal hypersensitivity*. *Veterinary Immunology and Immunopathology* **30**: 307–320.
- MARTINEZ-GOMEZ J.M., JOHANSEN P., ERDMANN I., SENTI G., CRAMERI R. und KÜNDIG T.M. (2008) *Intralymphatic Injections as a New Administration Route for Allergen-Specific Immunotherapy*. *Allergy and Immunology* **150**: 59–65.
- MARZULLI F. (1962) *Barriers to skin penetration*. *J Invest Dermatol* **39**: 387–393.
- MCCAIG J. (1973) *A survey to establish the incidence of sweet itch in ponies in the United Kingdom*. *Vet Rec* **93**: 444–446.
- MEHLHORN H., WALLDORF V., KLIMPEL S., SCHAUB G., KIEL E., FOCKE R., LIEBISCH G., LIEBISCH A., WERNER D., BAUER C., CLAUSEN H., BAUER B., GEIER M., HÖRBRAND T., BÄTZA H.J., CONRATHS F.J., HOFFMANN B. und BEER M. (2009) *Bluetongue disease in Germany (2007-2008): monitoring of entomological aspects*. *Parasitological Research* **105**: 313–319.
- MEILER F., ZUMKEHR J., KLUNKER S., RÜCKERT B., AKDIS C.A. und AKDIS M. (2008) *In vivo switch to IL-10 secreting T regulatory cells in high dose allergen exposure*. *Journal of Experimental Medicine* **205**: 2887–2898.
- MEYER W. (1997) *Haut und Hautorgane*. Verlag Schaper, Alfeld, Hannover.
- M.HAWRYLOWICZ C. und A.O'GARRA (2005) *Potential role of Interleukin-10- secreting regulatory T cells in allergy and asthma*. *Immunology* **5**: 271–283.

- MIMURA T., AMANO S., FUNATSU H., YAMAGAMI S., ARAIE M., KAJI Y., ISHIDA Y., USUI T. und OKAMOTO S. (2004) *Correlations between allergen-specific IgE serum levels in patients with allergic conjunctivitis in spring*. Ocul Immunol Inflamm **12**: 45–51.
- MONDOULET L., DIOSZEGHY V., LIGOUIS M., DHELFT V., DUPONT C. und BENHAMOU P.H. (2009) *Epicutaneous immunotherapy on intact skin using a new delivery system in a murine model of allergy*. Clinical and Experimental Allergy **40**: 659–667.
- MORROW A., QUINN P. und BAKER K. (1986) *Dermal reactivity to histamine, serotonin and bradykinin in relation to allergic skin reactions of the horse*. J Vet Pharmacol Therapy **9**: 40–48.
- MÜLLER U.R., JUTEL M., REIMERS A., ZUMKEHR J., HUBER C., KRIEGEL C., STEINER U., HAEBERLI G., AKDIS M., HELBLING A., SCHNYDER B., BLASER K. und AKDIS C. (2008) *Clinical and immunologic effects of H1 antihistamine preventive medication during honeybee venom immunotherapy*. J Allergy Clin Immunol **122**: 1001–1007.
- NAKANISHI K. (2010) *Basophils are potent antigen-presenting cells that selectively induce Th2 cells*. Eur J Immunol **40**: 1836–1842.
- NASSER S.M.S., YING S., MENG Q., KAY A.B. und EWAN P.W. (2001) *Interleukin-10 levels increase in cutaneous biopsies of patients undergoing wasp venom immunotherapy*. Eur J Immunol **31**: 3704–3713.
- NEILL D.R., WONG S.H., A. BELLOSI, FLYNN R.J., DALY M., LANGFORD T.K.A., BUCKS C., KANE C.M., FALLON P.G., PANNELL R., JOLIN H.E. und MCKENZIE A.N.J. (2010) *Nuocytes represent a new innate effector leukocyte that mediates type-2 immunity*. Nature **464**: 1367–1370.

- NELSON H.S. (2007) *Allergen immunotherapy: Where is it now?*. J Allergy Clin Immunol **119**: 769–777.
- O'GARRA A., VIEIRA P., VIEIRA P. und GOLDFELD A. (2004) *IL-10-producing and naturally occurring CD4+ Tregs: limiting collateral damage*. J Clin Invest **114**: 1372–1378.
- OKADA H., KUHN C., FEILLET H. und BACH J.F. (2010) *The 'hygiene hypothesis' for autoimmune and allergic diseases: an update*. Clin Exp Immunol **160**: 1–9.
- O'NEILL W., MCKEE S. und CLARKE A. (2002) *Flaxseed (Linum usitatissimum) supplementation associated with reduced skin test lesional area in horses with Culicoides hypersensitivity*. Can J Vet Res **66**: 272–277.
- WWW.ANIMAL-HEALTH ONLINE.DE (2010) *Hintergrundinformationen, Allergien bei Hund und Katze*. www.animal-health-online.de/klein/2010/03/16/hintergrundinformationen-allergien-bei-hund-und-katze/5237/.
- PONVERT C. und SCHEINMANN P. (2003) *Vaccine allergy and pseudo-allergy*. Eur J Dermatol **13**: 10–15.
- POULSEN B.J. (1972) *Diffusion of drugs from topical vehicles: an analysis of vehicle effects*. Appleton Century Crofts Verlag, New York.
- PRAUSNITZ M.R. und LANGER R. (2008) *Transdermal drug delivery*. Nature Biotechnology **26**: 1261–1268.
- PSCHYREMBEL W. (2002) *Pschyrembel, Klinisches Wörterbuch*. Walter de Gruyter, Berlin, New York.

- QUINN P., BAKER K. und MORROW A. (1983) *Sweet itch: responses of clinically normal and affected horses to intradermal challenge with extracts of biting insects*. Equine Vet J **15**: 266–272.
- RANDOLPH G. (2001) *Dendritic cell migration to lymph nodes: cytokines, chemokines, and lipid mediators*. Semin Immunol **13**: 267–274.
- RIEDEL S. (2003) Vergleichende Untersuchungen zur dermalen Penetration und Permeation in Diffusionszellen. Ph.D. thesis, Tierärztliche Hochschule Hannover.
- ROLLAND J.M., GARDNER L. und O’HEHIR R.E. (2009) *Allergen-related approaches to immunotherapy*. Pharmacology and Therapeutics **121**: 273–284.
- ROMMEL M., ECKERT J., KUTZER E., KÖERTING W. und SCHNIEDER T. (2000) Veterinärmedizinische Parasitologie. Parey Buchverlag, Berlin, Wien.
- RÜSBÜLDT A. (2007) Sommerkeczem Vorbeugen - Erkennen - Behandeln. Cadmos Verlag GmbH, Brunsbek.
- SAKAGUCHI S., YAMAGUCHI T., NOMURA T. und ONO M. (2008) *Regulatory T Cells and Immune Tolerance*. Cell **133**: 775–787.
- SCADDING G., SHAMJI M., JACOBSON M., LEE D., WILSON D., LIMA M., PITKIN L., PILETTE C., NOURI-ARIA K. und DURHAM S. (2010) *Sublingual grass pollen immunotherapy is associated with increases in sublingual Foxp3-expressing cells and elevated allergen-specific immunoglobulin G4, immunoglobulin A and serum inhibitory activity for immunoglobulin E-facilitated allergen binding to B cells*. Clin Exp Allergy **40**: 598–606.
- SCHÄFER H., ZESCH A. und STÜTTGEN G. (1982) Skin permeability. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.

- SCHMIDT U. (2003) *Transdermale Pflaster - Arzneimittel zum Aufkleben*. Spektrum der Wissenschaft **10**: 42.
- SCHMIDT-WEBER C.B., AKDIS M. und AKDIS C. (2007) *TH17 cells in the big picture of immunology*. J Allergy Clin Immunol **120**: 247–254.
- SCHNEIDER (1999) *Das Sommerkezem der Islandpferde - Ausdruck einer chronischen Ausleitungsschwäche*. www.pferdemedizin.com/sommerekzem.
- SCHULER G., ROMANI N. und FRITSCH P. (1982) *Differential lectin binding to mammalian keratinocytes and melanocytes in vitro*. Eur J Cell Biol **27**: 88–95.
- SCHULER G. und STEINMAN R.M. (1985) *Murine epidermal Langerhans cells mature into potent immunostimulatory dendritic cells in vitro*. Journal of Experimental Medicine **161**: 526–546.
- SCHWARTZ R.H., MUELLER D.L., JENKINS M. und QUILL H. (1989) *T-cell clonal anergy*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol **54**: 605–610.
- SCOTT D.W. und MILLER W.H. (2003) *Structure and Function of the Skin*. Equine Dermatology **1**: 1–58.
- SECRIST H., CHELEN C.J., WEN Y., MARSHALL J.D. und UMETSU D.T. (1993) *Allergen immunotherapy decreases interleukin 4 production in CD4+ T cells from allergic individuals*. Journal of Experimental Medicine **178**: 2123–2130.
- SENTI G., GRAF N., HAUG S., RÜDI N., VON MOOS S., SONDEREGGER T., JOHANSEN P. und KÜNDIG T.M. (2009a) *Epicutaneous allergen administration as a novel method of allergen-specific immunotherapy*. J Allergy Clin Immunol **124**: 997–1002.

- SENTI G., JOHANSEN P. und KÜNDIG T.M. (2009b) *Intralymphatic immunotherapy*. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology* **9**: 537–543.
- SHIDA M., KADOYA M., PARK S.J., NISHIFUJI K., MOMOI Y. und IWASAKI T. (2004) *Allergen-specific immunotherapy induces Th1 shift in dogs with atopic dermatitis*. *Veterinary Immunology and Immunopathology* **102**: 19–31.
- SIEBER J., KÖBERLEIN J. und MÖSGES R. (2010) *Sublingual immunotherapy in daily medical practice: effectiveness of different treatment schedules - IPD meta-analysis*. *Curr Med Res Opin* **26**: 925–932.
- SIMON J.C. (1994) *Die Haut - ein Immunorgan*. *Fortschrittliche Medizin* **112**: 20–21.
- STEINBACH F., DEEG C., MAUEL S. und WAGNER B. (2002) *Equine immunology: offspring of the serum horse*. *Immunology* **23**: 223–225.
- STOLL M. (2004) *Ökozon, die Sommerexzem - Kur frei Haus!*. www.pferdefit.de/oekozone-sommerexzem-frei-haus-p-73.html.
- STONE K.D., PRUSSIN C. und METCALFE D.D. (2010) *IgE, mast cells, basophils, and eosinophils*. *J Allergy Clin Immunol* **125**: 73–80.
- STREILEIN J. (1983) *Skin-associated lymphoid tissues (SALT): origins and functions*. *J Invest Dermatol (United States)* **80**: 12–16.
- STRID J., CALLARD R. und STROBEL S. (2006) *Epicutaneous immunization converts subsequent and established antigen-specific T helper type 1 (Th1) to Th2-type responses*. *Immunology* **119**: 27–35.
- STRID J., HOURIHANE J., KIMER I., CALLARD R. und STROBEL S. (2004) *Disruption of the stratum corneum allows potent epicutaneous*

- immunization with protein antigens resulting in a dominant systemic TH2 response.* Eur J Immunol **34**: 2100–2109.
- STRID J., HOURIHANEW J., KIMBERZ I., CALLARD R. und STROBEL S. (2005) *Epicutaneous exposure to peanut protein prevents oral tolerance and enhances allergic sensitization.* Clinical and Experimental Allergy **35**: 757–766.
- STROTHMANN-LÜERSEN A., KIETZMANN M. und ROSTOCK A. (1992) *Das Sommerkezem beim Islandpferd: Epidermale Eicosanoidkonzentration, Proliferationsparameter und histologische Veränderungen in betroffenen Hautpartien.* Pferdeheilkunde **6**: 385–390.
- STÜTTGEN G. und SCHÄFER H. (1974) Funktionelle Dermatologie. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- TARZI M., KLUNKER S., TEXIER C., VERHOEF A., STAPEL S.O., AKDIS C.A., MAILLIERE B., KAY A.B. und LARCHE M. (2006) *Induction of interleukin-10 and suppressor of cytokine signalling-3 gene expression following peptide immunotherapy.* Clinical and Experimental Allergy **36**: 465–474.
- TORRES M.J. und BLANCA M. (2010) *The complex clinical picture of beta-lactam hypersensitivity: penicillins, cephalosporins, monobactams, carbapenems, and clavam.* Med Clin North Am **94**: 805–820.
- UMETSU D., MCINTIRE J.J., AKBARI O., MACAUBAS C. und DE-KRUYFF R.H. (2002) *Asthma: an epidemic of dysregulated immunity.* Nat Immunol **3**: 715–720.
- VIGNALI D., COLLISON L. und WORKMAN C. (2008) *How regulatory T cells work.* Nat Rev Immunol **8**: 523–532.
- VOLLMAR A. und DINGERMAN T. (2005) Immunologie: Grundlagen und Wirkstoffe. WVG - Verlag, Stuttgart.

- WAGNER B., CHILDS B.A. und ERB H.N. (2008) *A histamine release assay to identify sensitization to Culicoides allergens in horses with skin hypersensitivity*. Veterinary Immunology and Immunopathology **126**: 302–308.
- WAGNER B., FLAMINIO J., HILLEGAS J., LEIBOLD W., ERB H.N. und ANTCZAK D. (2006b) *Occurrence of IgE in foals: evidence for transfer of maternal IgE by the colostrum and late onset of endogenous IgE production in the horse*. Veterinary Immunology and Immunopathology **110**: 269–278.
- WAGNER B. und FREER H. (2008) *Development of a bead-based multiplex assay for simultaneous quantification of cytokines in horses*. Veterinary Immunology and Immunopathology **127**: 242–248.
- WAGNER B., MILLER W., MORGAN E., HILLEGAS J., ERB H.N., LEIPOLD W. und ANTCZAK D. (2006a) *IgE and IgG antibodies in skin allergy of the horse*. Vet Res **37**: 813–825.
- WAGNER B., RADBRUCH A., ROHWER J. und LEIBOLD W. (2003) *Monoclonal anti-equine IgE antibodies with specificity for different epitopes on the immunoglobulin heavy chain of native IgE*. Veterinary Immunology and Immunopathology **92**: 45–60.
- WAGNER R. (2005) *Die spezifische Immuntherapie (Hyposensibilisierung) beim Pferd - eine sinnvolle Alternative?*. FFP-Fortbildung **22**: 1–7.
- WAITHMAN J., ALLAN R.S., KOSAKA H., AZUKIZAWA H., SHORTMAN K., LUTZ M.B., HEATH W.R., CARBONE F.R. und BELZ G.T. (2007) *Skin-Derived Dendritic Cells Can Mediate Deletional Tolerance of Class I-Restricted Self-Reactive T Cells*. Journal of Immunology **179**: 4535–4541.
- WHANG M.I., GUERRA N. und RAULET D.H. (2009) *Costimulation of dendritic epidermal gammadelta T cells by a new NKG2D ligand*

- expressed specifically in the skin.* Journal Immunology **182**: 4557–4564.
- WHITE S.D. und YAGER J.A. (1995) *Resident dendritic cells in the epidermis - Langerhans Cells, Merkel Cells and Melanocytes.* Vet Dermatol **6**: 1–8.
- WILSON A., MELLOR P. und RUSSELL C. (2008) *Identification of abundant proteins and potential allergens in Culicoides nubeculosus salivary glands.* Veterinary Immunology and Immunopathology **122**: 94–103.
- WOHLLEBEN G., TRUJILLO C., MÜLLER J., RITZE Y., GRUNEWALD S., TATSCH U. und ERB K.J. (2004) *Helminth infection modulates the development of allergen-induced airway inflammation.* International Immunology **16**: 585–596.
- WOHLRAB W. (2001) Pharmakokinetik in der Haut. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart.
- WWW.IOMAI.COM (2010) *IOMAI'S VACCINE PATCHES.* www.iomai.com/content/view/23/37/.
- WWW.VETIDATA.DE (2010) *Dimethylsulfoxid (DMSO).* Besondere Vorsichtsmassnahmen für die Anwendung bei Tieren.
- YAMAZAKI S., DUDZIAK D., HEIDKAMP G.F., FIORESE C., INABA A., NUSSENZWEIG M. und STEINMAN R. (2008) *CD8+CD205+ splenic dendritic cells are specialized to induce Foxp3+ regulatory T cells.* Journal Immunology **181**: 6923–6933.
- YERUHAM I., BRAVERMAN Y. und ORGAD U. (1993) *Field observations in Israel on hypersensitivity in cattle, sheep and donkeys caused by Culicoides.* Aust Vet J **70**: 348–52.

ZOSS A.R., KOCH C.A. und HIROSE R.S. (1937) *Alum-ragweed precipitate: preparation and clinical investigation*. J Allergy 8: 329–335.

Danksagung

Während der praktischen Tätigkeit meiner Doktorarbeit habe ich sehr viel Unterstützung und Anleitung erhalten. Allen diesen Personen möchte ich hiermit danken. Als erster ist Prof. Manfred Lutz zu nennen, der mir das wissenschaftliche Denken und Arbeiten vermittelt hat und der für alle meinen Fragen immer eine Lösung wußte. Danke für die spannenden zwei Jahre und vielen Dank für deine Geduld!

Gudrun Schell möchte ich dafür danken, dass sie mich in allen relevanten, wissenschaftlichen Methoden eingewiesen und mich zur Genauigkeit ermahnt hat. Bei meinen Pferdetouren stand sie mir immer zur Seite. Es war eine schöne Zeit mit dir.

Eine wunderschöne Zeit im Labor haben mir auch alle meine weiteren Kollegen bereitet: Anja Döhler, Caroline Brandl, Katrien Ple-tinckx, Jens Hänig, Eliana Ribecchini und Marion Heuer. Mit ihnen habe ich Freud und Leid geteilt. Ich werde euch niemals vergessen! Tea Gogshvili aus der Arbeitsgruppe Hünig brachte mir alles über das Handling mit dem Mausmodell bei und hatte stets ein offenes Ohr für meine Fragen. Claudia Siedel aus der Arbeitsgruppe Becker half mir die Lungenpräparate fertig zu stellen und war mir gerade in der letzten Phase meiner Doktorarbeit eine große Hilfe. Nora Müller arbeitete sich extra für mich in die Fotografie von histologischen, HE gefärbten Schnitten ein und nahm mit mir die Bilder der Mauslungen auf. Bei euch allen möchte ich mich ganz herzlich bedanken. Eure Hilfe war wirklich keine Selbstverständlichkeit und ich bin sehr dankbar dafür, diese Unterstützung erhalten zu haben. Bei Andre Welp und Reiner Klemm aus der Firma LDN, Labor

Diagnostika Nordhorn möchte ich mich für die Zusammenarbeit bedanken. Die Entwicklung des 'Histamin Research ELISAS' war eine spannende Erfahrung für mich und es war sehr angenehm mit Ihnen auch über den rein finanziellen Aspekt hinaus die wissenschaftlichen Ergebnisse diskutieren zu können.

Bedanken möchte ich mich auch bei Prof. Thomas Göbel, der sofort eingewilligt hat meine Doktorarbeit von München aus mit zu betreuen. Die Gespräche mit ihm halfen mir stets meine wissenschaftlichen Ergebnisse aus einer anderen Sicht zu betrachten. Vielen Dank für die Antworten, die Sie mir speziell auf meine tiermedizinischen Fragen gegeben hatten.

Auf keinen Fall möchte ich versäumen, mich bei den vielen Pferdebesitzern zu bedanken! Ohne sie würde es diese Doktorarbeit in der Form nicht geben!

Für die ausführliche Einarbeitung in das TeXLaTeX-Programm möchte ich mich bei der veterinärmedizinischen Rechnerbetriebsgruppe der LMU München und dort vor allem bei Chris van der Meijden und Julia Albers herzlich bedanken. Es ist nicht nur, dass durch eure Hilfe meine Doktorarbeit schöner strukturiert wurde, sondern auch, dass ich durch euch die Fertigkeit erlangt habe, mit einem solchen Programm umgehen zu können.

Neben all den wissenschaftlichen Aspekten, habe ich durch das EXIST-Stipendium sehr viel wirtschaftliches Knowhow erlangt. Dies habe ich vor allem Christian Andersen, Marcela Fajardo-Moser, Carolin Seubert und Gerald Böhm zu verdanken. Danke für eure Geduld und Mühen euer Wissen an mich weiterzugeben!

Meinem Onkel Johannes Schelbert und meiner Tante Karin Schelbert verdanke ich es, dass ich mich in Würzburg sofort heimisch gefühlt habe. Vielen Dank, dass ich bei euch wohnen durfte und ihr immer ein offenes Ohr für meine Sorgen hattet.

Auch meinen Eltern, Walter und Roswitha Laube, meinen Geschwistern Julia Bayerl und Monika Laube und meiner Oma, Rosemarie Schelbert, gebührt großer Dank. Durch viele Gespräche habt ihr mich immer wieder auf den Boden der Tatsachen zurück geholt und seit mir emotional die beste Unterstützung gewesen, die ich mir

wünschen konnte. Schön, dass ich euch habe!

Während dieser Doktorarbeit gab es viele Hochs und Tiefs. Am meisten musste mein Freund Ole diese ausgleichen. Vielen Dank, dass du für mich da warst und mir geholfen hast, die Dinge wieder in die richtige Reihenfolge zu bringen, die mir schwer zu schaffen gemacht haben. Danke, dass es dich gibt.